

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**“NUEVO MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO  
DIALIZABLE DE LEUCOCITOS DE BOVINO Y VALIDACIÓN DE  
SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTI-INFLAMATORIA *in vitro*”**

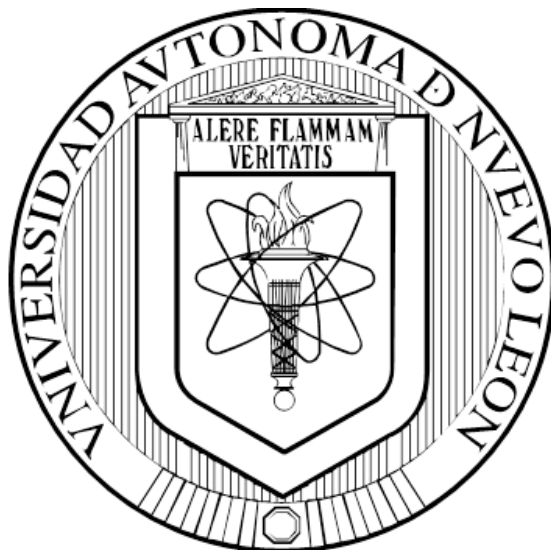
**POR**

**MARÍA FERNANDA CERVANTES WONG**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**ENERO, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“NUEVO MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE  
LEUCOCITOS DE BOVINO Y VALIDACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTITUMORAL Y ANTI-INFLAMATORIA *in vitro*”**

**POR**

**MARÍA FERNANDA CERVANTES WONG**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**ENERO, 2017**

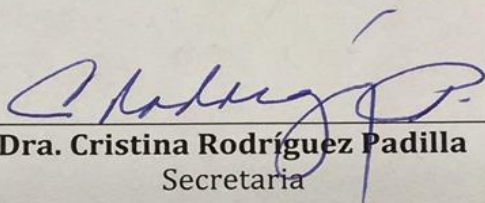
**“NUEVO MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE  
LEUCOCITOS DE BOVINO Y VALIDACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTITUMORAL Y ANTI-INFLAMATORIA *in vitro*”**

**Comité de Tesis**



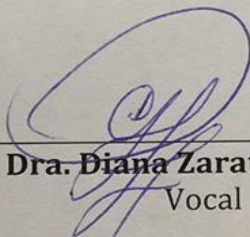
---

**Dr. Moisés Armides Franco Molina**  
Director de tesis



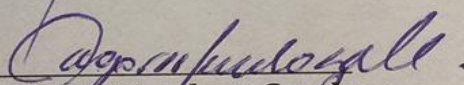
---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Secretaria



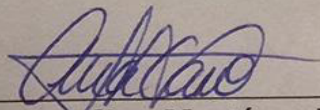
---

**Dra. Diana Zarate Triviño**  
Vocal



---

**Dr. Edgar Mendoza Gamboa**  
Vocal



---

**Dra. Ana Carolina Martínez Torres**  
Vocal



**El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en conjunto con el Centro de Investigación y de Estudios Superiores del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) unidad Querétaro y Centro de Innovación, investigación y desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) ubicado en parque PIIT.**

# TABLA DE CONTENIDO

<b>SECCIÓN</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>8</b>
<b>DEDICATORIAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
2.1.    Cáncer.....	17
2.1.1.    Líneas celulares de cáncer .....	17
2.1.2.    Epidemiología .....	19
2.2.    Inflamación .....	26
2.2.1.    Enfermedades inflamatorias.....	26
2.2.2.    Activación de NFκB en la respuesta inmune e inflamatoria .....	27
2.2.3.    Citocinas involucradas en inflamación .....	29
2.2.4.    Tratamiento convencional en procesos inflamatorios.....	32
2.3.    Inmunoterapia.....	33
2.4.    Extracto dializable de leucocitos de bovino, EDLb.....	35
2.4.1.    Composición del EDLb .....	36
2.4.2.    Mecanismo de acción.....	37
2.4.3.    Actividad antitumoral del extracto dializable de leucocitos (EDL) .....	38
2.4.4.    Otros usos del EDLb .....	39
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>42</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>43</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>43</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
7.1.    Animales.....	44
7.2.    Cultivo celular.....	44

7.2.1.	Obtención de macrófagos peritoneales de murino .....	44
7.2.2.	Obtención de células derivadas de médula ósea de murino .....	44
7.2.3.	Obtención de células mononucleares de sangre periférica de humano (PBMC). ....	45
7.3.	Elaboración del Extracto Dializable de Leucocitos de bovino (EDLb) .....	45
7.3.1.	Preparación del Extracto Dializable de Leucocitos de bovino (EDLb) por el método clásico	45
7.3.2.	Preparación del Extracto Dializable de Leucocitos de bovino (EDLb) a partir de bazo seco	46
7.4.	Caracterización del EDLb clásico y el EDLb seco mediante análisis bromatológico, espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FT-IR), difracción de rayos X, potencial zeta y microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	46
7.4.1.	Análisis bromatológico .....	46
7.4.2.	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FT-IR).....	47
7.4.3.	Potencial zeta .....	47
7.4.4.	Microscopio electrónico de barrido (SEM).....	48
7.4.5.	Difracción de rayos X.....	48
7.5.	Determinación de viabilidad celular de líneas celulares de cáncer con tratamiento de EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco. ....	49
7.5.1.	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry .....	49
7.5.2.	Determinación de viabilidad celular mediante reducción de MTT.....	49
7.6.	Evaluar si los tratamientos con EDLb clásico y EDLb seco tienen la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70 y MCP-1) y especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS.	52
7.6.1.	Preparación de estándares de inflamación de ratón.....	53
7.6.2.	Preparación de mezcla de perlas de captura de inflamación de ratón (Mixed Mouse Inflammation Capture Beads) .....	54
7.6.3.	Procedimiento de ensayo de CBA Mouse Inflammation.....	54
7.6.4.	Determinación de especies reactivas de oxígeno .....	55
7.7.	Evaluar si los tratamientos con EDLb clásico y EDLb seco tienen la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-1 $\beta$ y IL-8) y especies reactivas de oxígeno (ROS) en células mononucleares de sangre periférica de humano estimuladas con LPS. ....	55
7.7.1.	Determinación de especies reactivas de oxígeno .....	56
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
8.1.	Caracterización del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco .....	56

8.1.1.	Análisis bromatológico .....	56
8.1.2.	Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FT-IR) .....	57
8.1.3.	Difracción de rayos X (XRD) .....	60
8.1.4.	Potencial zeta .....	61
8.1.5.	Microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	62
8.2.	Actividad antitumoral .....	64
8.2.1.	Cuantificación de proteína por el método de Lowry .....	64
8.3.	Actividad anti-inflamatoria en macrófagos peritoneales de murino .....	66
8.4.	Actividad anti-inflamatoria en células mononucleares de sangre periférica de humano 71	
8.5.	Evaluación de la expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en macrófagos peritoneales de murino.....	75
8.6.	Evaluación de la expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en células mononucleares de sangre periférica de humano.....	77
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>78</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>82</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>83</b>
<b>12.</b>	<b>BIBIOGRAFÍA .....</b>	<b>84</b>

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por aceptarme y confiar en mi capacidad para lograr un objetivo de mi vida, al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme realizar el proyecto de investigación y el apoyo económico y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca durante este tiempo.*



## AGRADECIMIENTOS

*A mi familia principalmente, a mi madre Marisol, a mi papá Fernando, a mis hermanos Fernando, Goretty, José Guillermo, a mis sobrinos Fernando, Marisolita y Goretty, por ser el motor de mi vida, por el ánimo, el apoyo y el amor incondicional que me brindan en cada etapa de mi vida.*

*A mis amigos, por todos aquellos momentos de felicidad, estrés y éxito que tuvimos en todo este tiempo. Yareellys Ramos Zayas, Erika Coronado Cerda, Carmen Rodríguez Salazar, Violeta Hernandez Puente, Martín García Juárez, Carlos Martínez Armenta, Leonardo Guzmán, Daniela Mata Cardona, Zyanya Díaz Hirashi, David Corro Mendivil, Jenny Rodríguez, César Romo Saenz, Don David, gracias por todo, siempre formaran parte de mi vida, los quiero.*

*Al Dr. Moisés Franco, por toda la enseñanza que me brindó en este tiempo y guiarme en la realización de mi proyecto, pero sobre todo por su paciencia. Gracias por todo doc*

*A la dra. Diana Zárate, por ayudarme para la realización de este proyecto y compartir su conocimiento conmigo y por una buena amistad que llegamos a hacer, gracias doctora.*

*Al Dr. Edgar Mendoza Gamboa, por siempre estar ahí cuando lo necesitamos para cualquier duda o aclaración, por impartir conocimientos a mis compañeros y a mi, gracias doctor.*

*A Dios mi padre y la Virgen por tantas bendiciones que me han dado*

## DEDICATORIAS

*A mi madre María Soledad Wong Ruíz*

*Este trabajo, te lo dedico con mucho amor y cariño, es menos de lo que podría darte después de tantos años de amor y apoyo incondicional, nadie me ha brindado tanto como tu lo has hecho, gracias chaparrita hermosa por que sin tí no tendría tantas aspiraciones y ganas de salir adelante, porque tú eres quién me ánima y me motiva para seguir luchando por mis sueños, gracias por tanto.*

*Te amo.*

# LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Información sobre líneas celulares de cáncer .....	20
<b>Tabla 2.</b> Factores de riesgo de cáncer .....	23
<b>Tabla 3.</b> Miembros de la familia NFκB en mamíferos .....	28
<b>Tabla 4.</b> Agentes inmunológicos en enfermedades inflamatorias .....	36
<b>Tabla 5.</b> Enfermedades estudiadas con el factor de transferencia .....	41
<b>Tabla 6.</b> Condiciones experimentales para el ensayo de actividad antiinflamatoria del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco en macrófagos peritoneales de murino .....	54
<b>Tabla 7.</b> Condiciones experimentales para el ensayo de actividad antiinflamatoria del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco en células mononucleares de sangre periférica de humano .....	56
<b>Tabla 8.</b> Determinación de análisis bromatológico del EDLb a partir de bazo seco y el EDLb clásico .....	57
<b>Tabla 9.</b> Principales bandas de espectro de infrarrojo del EDLb a partir de bazo seco y EDLb clásico .....	58
<b>Tabla 10.</b> Valores de potencial zeta del EDLb clásico y el EDLb seco .....	62
<b>Tabla 11.</b> Dosis letal media de los tratamientos con EDLb seco y EDLb clásico en líneas celulares de cáncer .....	67

# LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Mortalidad de diversos tipos de cáncer entre hombres y mujeres .....	21
<b>Figura 2.</b> Estimado de nuevos casos de cáncer y muertes para el año 2012 en población hispana .....	21
<b>Figura 3.</b> Incidencia de cancer en el mundo según la región .....	22
<b>Figura 4.</b> Estadío de distribución de cáncer en hispanos y no hispanos (NHW por sus siglas en inglés) de tipos de cáncer con mayor incidencia del año 2005 al 2009.....	22
<b>Figura 5.</b> Incidencia de cáncer por género en México. <i>Organización Mundial de la Salud</i> , 2014 .....	23
<b>Figura 6.</b> Estímulo de NFκB y genes blanco .....	29
<b>Figura 7.</b> Vía clásica y alternativa de NFκB .....	29
<b>Figura 8.</b> Citocinas involucradas en respuesta inflamatoria aguda y crónica .....	33
<b>Figura 9.</b> Células del sistema inmune y sus función en respuesta a células tumorales .....	35
<b>Figura 10.</b> Modelo hipotético del mecanismo de acción del EDLb en la modulación de citocinas .....	39
<b>Figura 11.</b> Estructura de MTT y producto coloreado de formazán .....	51
<b>Figura 12.</b> Espectro de infrarrojo del EDLb a partir de bazo seco (en rojo) y EDLb clásico (en negro) .....	59
<b>Figura 13.</b> Zona de la huella digital en el espectro de infrarrojo del EDLb clásico (negro) y EDLb seco (rojo) .....	60
<b>Figura 14.</b> Difractograma de rayos X del EDLb a partir de bazo seco (rojo) y EDLb clásico (negro) .....	61
<b>Figura 15.</b> Valores de potencial zeta del EDLb clásico (en negro) y EDLb seco (en rojo) de acuerdo al pH .....	62
<b>Figura 16.</b> Micrografías tomadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	63
<b>Figura 17.</b> Análisis químico-elemental en microscopio electrónico de barrido .....	64
<b>Figura 18.</b> Curva de viabilidad en líneas celulares de cáncer tratadas con EDLb seco .....	65
<b>Figura 19.</b> Curva de viabilidad en líneas celulares de cáncer tratadas con EDLb clásico .....	66
<b>Figura 20.</b> Actividad antiinflamatoria en macrófagos peritoneales murino estimulados con de LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 5 horas .....	68
<b>Figura 21.</b> Actividad antiinflamatoria en macrófagos peritoneales murino estimulados con de LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 24 horas .....	69
<b>Figura 22.</b> Actividad antiinflamatoria en macrófagos peritoneales murino estimulados con de LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 48 horas .....	71

<b>Figura 23.</b>	Actividad antiinflamatoria en células de sangre periférica estimuladas con de LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 5 horas .....	73
<b>Figura 24.</b>	Actividad antiinflamatoria en células de sangre periférica estimuladas con de LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 12 horas .....	74
<b>Figura 25.</b>	Actividad antiinflamatoria en células de sangre periférica estimuladas con de LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 24 horas .....	75
<b>Figura 26.</b>	Expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en macrófagos peritoneales de murino por microscopía de fluorescencia .....	77
<b>Figura 27.</b>	Expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en células mononucleares de sangre periférica de humano por microscopía de fluorescencia .....	79

## NOMENCLATURA

EDLb	Extracto dializado de leucocitos de bovino
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
TLR	Receptor tipo toll
NO	óxido nítrico
NF $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
LPS	Lipopolisacárido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier
XRD	Difracción de rayos X
SEM	Microscopio electrónico de barrido
AINE's	Antiinflamatorios no esteroideos
rpm	Revoluciones por minuto
mg	Miligramos
mL	Mililitros
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ L	Microlitros

# INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja en donde las células de un tejido específico ya no son totalmente sensibles a las señales dentro del tejido que regulan la diferenciación celular, la supervivencia, la proliferación y la muerte. Como resultado, estas células se acumulan en el tejido, causando daño local e inflamación (Nature, 2016).

En México durante el año 2014 se registraron un total de defunciones por cáncer de 605,000 de una población de 121,000,000, ocupando el primer lugar el cáncer de próstata con un 17% y el cáncer de mama con un 15.8% en hombres y mujeres, respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos sobre la incidencia de cáncer, los principales factores de riesgo siguen siendo fumar tabaco, inactividad física y obesidad (Organización Mundial de la Salud 2016).

La inflamación puede ser causada por una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Los principales promotores de la inflamación son infección, daño en algún tejido en específico o generalizado y estrés, estas son algunas de las condiciones adversas que conducen a inflamación (Medzhitov Ruslan *et al*, 2008).

Los tratamientos convencionales contra el cáncer son quimioterapia, radioterapia y cirugía; sin embargo, sabemos que las dos primeras resultan muy agresivas para los pacientes, no son específicas del tipo de cáncer y no garantizan la total remisión de éste, en cuanto a la cirugía depende del estadio en que se encuentre el tumor y las condiciones del paciente. Es por ello que en los últimos años se ha incluido la inmunoterapia como tratamiento alternativo para estos padecimientos ya que no solo mejoran la calidad de vida de los pacientes sino que refuerzan al sistema inmunológico para atacar células transformadas (Arnaudov Atanas *et al*, 2015).

En el año de 1949, el Dr. Henry Sherwood Lawrence descubrió que la respuesta inmunitaria podía ser transferida de un donante inmunocompetente a un receptor inmunocomprometido mediante la inyección de un extracto de leucocitos de sangre periférica (Lawrence HS. *et al*, 1955).

El extracto dializable de leucocitos de bovino (EDLb) proviene de una mezcla heterogénea de sustancias por debajo de 12 kDa; las cuales se obtienen del rompimiento de leucocitos y posteriormente se realiza una diálisis, obteniendo así el EDLb (Antonín Vacek *et al*, 2000).

A pesar de que se desconoce el mecanismo de acción del EDLb se sabe que tiene efecto antitumoral, anti-inflamatorio y antioxidante, de acuerdo a estudios no solo es empleado para estas afecciones sino también tiene efecto en proliferación y maduración celular, dichos estudios pueden ser altamente empleados para los diversos tipos de leucemia (Antonín Vacek 2000), se ha visto que tiene efecto antiviral en pacientes con infección por virus de inmunodeficiencia humana tipo I, en el cual reduce la transcripción de las partículas virales durante la infección y promueve una protección celular (Celia Fernández-Ortega 2008, Humberto H Lara 2011) de igual manera actúa contra virus del herpes, según estudios recientes (Salinas Nohemí *et al*, 2015).

En cuanto al efecto antitumoral del EDLb para diversos tipos de cáncer, se incluyen, cáncer de mama, próstata, pulmón, diversos tipos de leucemia, linfoma, entre otros (Franco Molina MA, 2006; Lara Humberto, 2010), ha sido ampliamente utilizado en conjunto con quimioterapia y radioterapia, ya que estudios recientes indican que además de ser específico de tumor, no provoca efectos adversos, y al ser un inmuno-modulador ayuda a la proliferación de células sanas (Crystal L. Mackall *et al*, 1994; Antonín Vacek *et al*, 2000; Homberg Toni *et al*, 2015).

El método de obtención de la manera clásica para el EDLb consiste en la homogenización del bazo precedido de la diálisis y por último la liofilización; en el proceso de homogenización y dializado es factible la contaminación con microorganismos, siendo una de las desventajas que presenta este proceso (Franco Molina Moisés *et al*, 2006).

En el presente estudio se plantea generar una innovación a la metodología de obtención de el EDLb, con la finalidad de disminuir costos de producción, facilitar el manejo de la materia prima y disminuir la contaminación microbiológica del producto, sin afectar su efecto biológico.



# ANTECEDENTES

## Cáncer

El cáncer puede comenzar en cualquier parte del cuerpo, las células sanas tienen mecanismos de regulación sobre crecimiento, división, proliferación y muerte; sin embargo en el cáncer esto se pierde, por lo que estas células transformadas ya no son capaces de regular dichos mecanismos habiendo crecimiento, división y proliferación descontrolada con incremento en la supervivencia generando tumores sólidos; en el caso de cáncer en sangre, tales como leucemias, generalmente no se forman tumores sólidos (National Institute of Health). Otra característica que presenta el cáncer es su capacidad de diseminación hacia otros tejidos a través del torrente sanguíneo o los vasos sanguíneos, lo que llamamos metástasis. Para que ocurra metástasis, aquellas células que tienen la capacidad invasiva y de diseminación, deben enfrentarse a diferentes obstáculos antes de invadir tejidos distantes, siendo el papel del sistema inmunológico frente a tumores uno de los principales (Massagué and Obenauf 2016). El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos es necesario para el combate de esta enfermedad, en este proceso el estudio *in vitro* de estos compuestos empleando líneas celulares tumorales es indispensable para determinar su efecto antitumoral. A continuación se describen las características de las diferentes líneas celulares de tumor empleadas en esta investigación.

### 1.1.1. Líneas celulares de cáncer

#### Carcinoma de pulmón

Giard DJ y colaboradores en el año de 1973 lograron aislar y establecer diversas líneas celulares de cáncer a partir de tumores sólidos, entre los que se incluyen carcinomas, sarcomas, melanomas y tumores en cerebro. Uno de los principales parámetros que evaluaron fue la capacidad de proliferación y mantenimiento de estas células transformadas, observando que la línea celular A427, siendo carcinoma de pulmón, presentó un porcentaje de formación de colonias de hasta el 84% en presencia de fibroblastos y crecimiento rápido en pruebas de tumorigenicidad en ensayos *in vivo*. El tumor se obtuvo a partir de una biopsia de tumor sólido de carcinoma de pulmón de una mujer caucásica de 58 años de edad (Giard et al. 1973).

### **Melanoma murino**

La línea celular B16F10 corresponde a melanoma de la cepa C57BL6 de murino. Fidler y colaboradores observaron en un ensayo previo *in vivo* que el melanoma murino tenía la capacidad de formar metástasis en tejido pulmonar, observando que esta línea es además empleada para ensayos de transfección (Fidler 1973) (Fidler 1975).

### **Carcinoma hepatocelular**

En el caso de la línea celular HEPG2 correspondiente a carcinoma hepatocelular, se aisló a partir de una biopsia de tumor sólido en el año 1979 de un joven caucásico de 15 años de edad. Las principales aplicaciones de ésta línea celular fueron realizar vacunas contra hepatitis B, screening en drogas con potencial carcinogénico y mutagénico (Knowles, Howe, and Aden 1980).

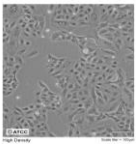
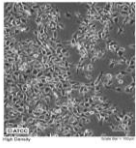
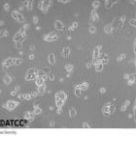
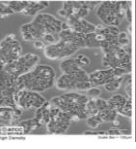
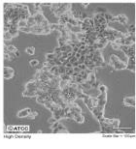
### **Adenocarcinoma colorectal**

La línea celular HT-29 corresponde a un adenocarcinoma colorectal de una mujer caucásica de 44 años de edad y fue aislada de un tumor primario por Fogh y Trempe en el año 1975 (Fogh, Fogh, and Orfeo 1977). Inicialmente esta línea se empleó para estudiar aspectos biológicos de cáncer humano. Sin embargo, éstas células llamaron la atención por el hecho de que eran capaces de expresar ciertas características de células intestinales maduras, como los enterocitos y células productoras de moco (Martínez-Maqueda, Miralles, and Recio 2015).

### **Adenocarcinoma mamario**

La línea celular MCF7 proporciona diversas características como el procesamiento de estradiol por receptores de estrógenos citoplasmáticos, expresa el oncogen WNT7B, siendo éste un gen que codifica para proteínas de señalización durante la embriogénesis (Huguet et al. 1994). En otros estudios se comprobó que el crecimiento celular de MCF7 es inhibido en presencia de factor de necrosis tumoral alpha (Sugarman et al. 1985)

Tabla 1. Información sobre líneas celulares de cáncer

Línea celular	Información general				Características	
	Organismo	Tejido	Tipo celular	Enfermedad	Imagen	Derivado
A427	<i>Homo sapiens</i> , humano	Pulmón	Epitelial	Carcinoma		A partir de tejido carcinomatoso de pulmón de hombre caucásico de 52 años de edad
B16F10	<i>Mus musculus</i> , mouse	Piel	Mezcla se células tipo epiteliales y forma con prolongaciones	Melanoma		A partir de cepa de ratón C57BL/6J
HEPG2	<i>Homo sapiens</i> , humano	Hígado	Epitelial	Carcinoma hepatocelular		Hombre caucásico de 15 años de edad
HT-29	<i>Homo sapiens</i> , humano	Colón	Epitelial	Adenocarcinoma colorectal		Mujer caucásica de 44 años de edad
MCF7	<i>Homo sapiens</i> , humano	Glándula mamaria	Epitelial	Adenocarcinoma		Mujer caucásica de 69 años de edad

Tomado de *American Type Culture Collection*, ATCC.

### 1.1.2. Epidemiología

Durante el año 2012 según la Organización Mundial de la Salud el total de defunciones por cáncer fue de 8.2 millones alrededor del mundo.

De acuerdo al perfil de mortalidad por cáncer según la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante el 2014, fue de 605,000 de una población de 121,000,000 en México, ocupando el primer lugar cáncer de próstata y cáncer de mama en hombres y mujeres, respectivamente, como se muestra en la Figura 1.

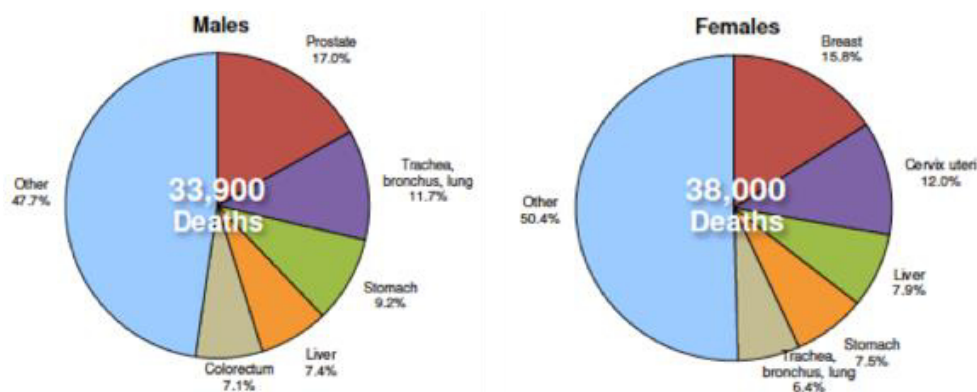
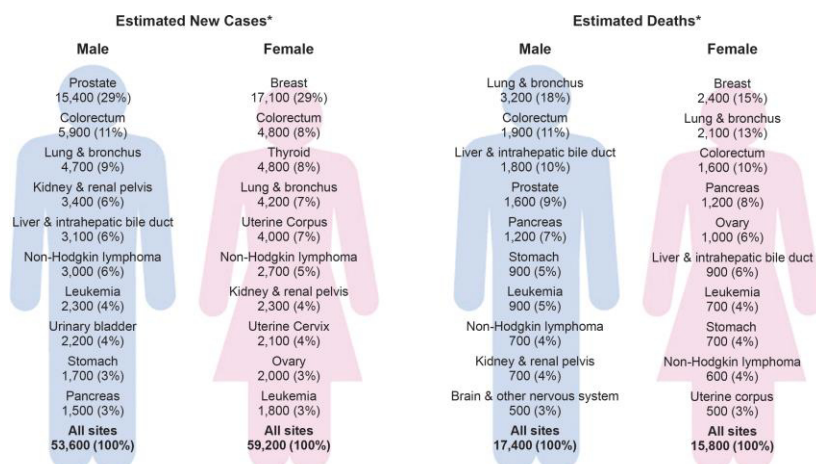


Figura 1. Mortalidad de diversos tipos de cáncer entre hombres y mujeres.

Organización Mundial de la Salud, 2014

### 1.1.3. Incidencia de cáncer

Durante el año 2012 se estimaba que alrededor de 112,800 casos nuevos de cáncer afectarían a la población hispana, los cuales incluyen mexicanos, puertorriqueños, cubanos y dominicanos en su gran mayoría. En el caso de hombres los tipos de cáncer comunmente diagnosticados son cáncer de próstata (29%), colorectal (11%) y de pulmón (9%). En el caso de las mujeres resultaron ser cáncer de mama (29%), colorectal (8%) y tiroides (8%) según el programa *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) del *National Cancer Institute* (NCI) (Siegel, Naishadham, and Jemal 2012). De acuerdo a la Figura 2, se puede observar el porcentaje de nuevos casos de cáncer y defunciones estimados para el año 2012.



\*Excludes basal cell and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

Figura 2. Estimado de nuevos casos de cáncer y muertes para el año 2012 en población hispana.

Según el *Cancer Research Worldwide UK* la incidencia de cáncer en el mundo es de 14,090,149 nuevos casos por año, en las siguiente Figura 3 se puede observar la incidencia según la región.

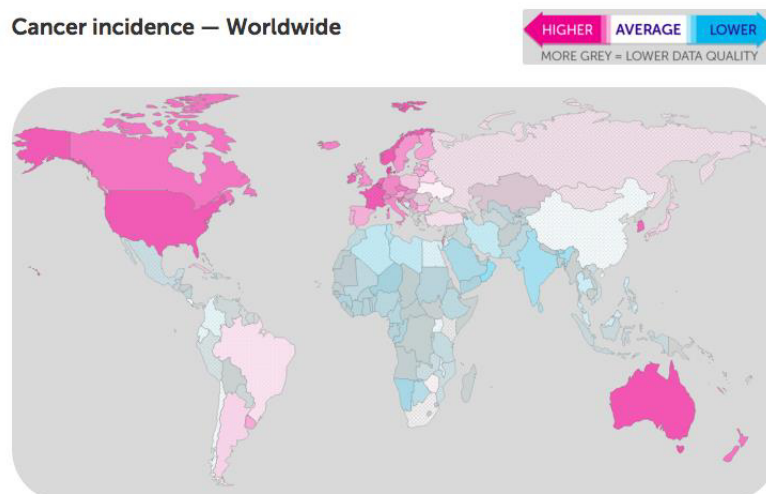


Figura 3. Incidencia de cancer en el mundo según la región. *Cancer Research Worldwide UK, 2012*

Según el programa de *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) del *National Cancer Institute* (NCI) se compararon entre la población hispana y no hispana diferentes tipos de cáncer, tales como mama, cervicouterino, colorectal, melanoma, próstata y pulmón, en la Figura 4 se observa que tanto la población hispana y no hispana presentaron el mismo patrón de localización.

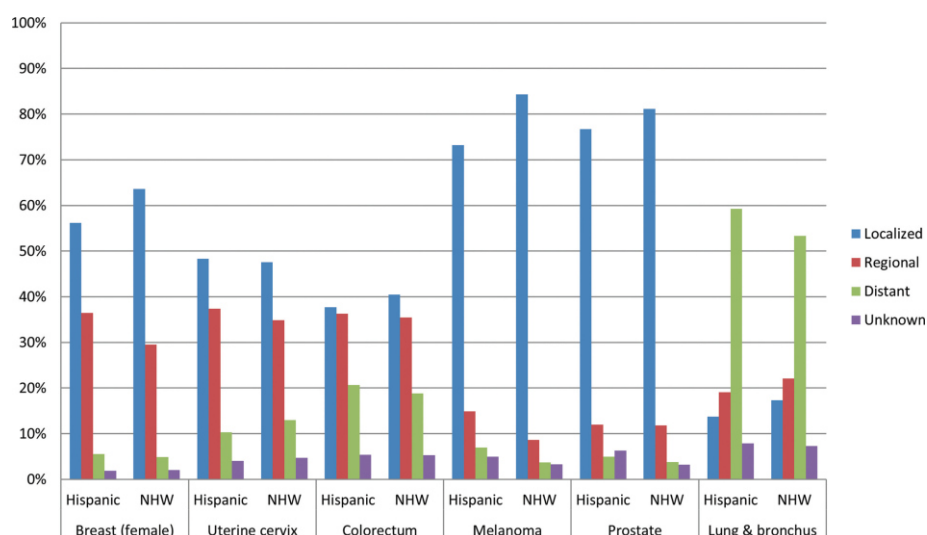


Figura 4. Estadío de distribución de cáncer en hispanos y blancos no hispanos (NHW por sus siglās en inglés) de tipos de cáncer con mayor incidencia del año 2005 al 2009.

#### 1.1.4. Incidencia de cáncer en México

De acuerdo con los datos obtenidos por parte de la OMS en México durante el 2014, podemos observar en la Figura 5 el grado de incidencia, teniendo más de 14,000 casos de cáncer de próstata en hombres y más de 20,000 casos de cáncer de mama en mujeres.

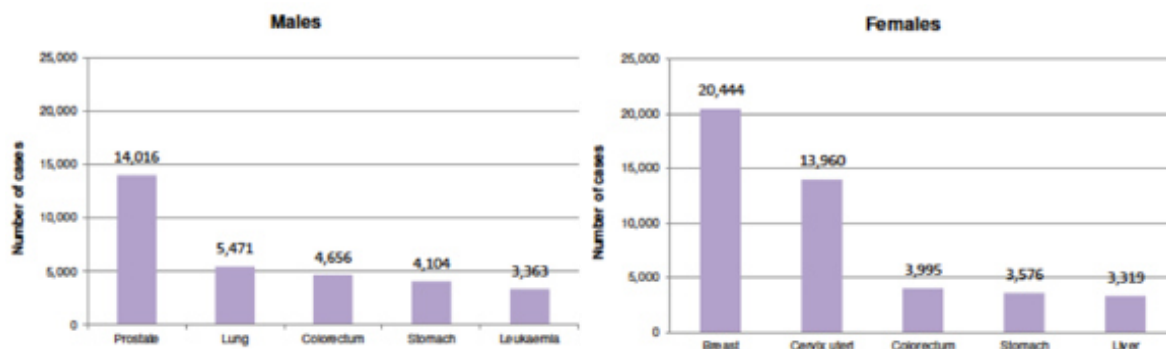


Figura 5. Incidencia de cáncer por género en México. Organización Mundial de la Salud, 2014.

#### 1.1.5. Factores de riesgo

Existen algunas factores involucrados en el desarrollo de los diversos tipos de cáncer en general, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores de riesgo de cáncer

Factor de riesgo	Hombres	Mujeres	Total
Fumador de tabaco frecuente (2011)	27%	8.2%	17.4%
Consumo total de alcohol <i>per capita</i> , en litros de alcohol puro (2010)	12.4	2.6	7.2
Inactividad física (2014)	18.9%	31.2%	25.4%
Obesidad (2014)	22.1%	32.7%	27.6%

Organización mundial de la salud (OMS), 2014.

#### 1.1.6. Tratamiento convencional

##### Cáncer de pulmón

La línea celular A549 empleada en el proyecto de investigación pertenece al grupo de cáncer de pulmón de células no pequeñas. El cáncer de pulmón de células no pequeñas tienen una alta expresión de fosfolipasa citosólica A2 (cPLA<sub>2</sub>) y ciclooxigenasa 2 (COX-2).

Las células de éste tipo de cáncer también tienen un gran incremento en la expresión de prostaglandinas ( $\text{PGE}_2$ ). Algunos tipos de cáncer de pulmón también expresan RNA 12-lipooxigenasa y proteína 12-lipooxigenasa y biosintetizan ácido 12(S)-hidroxieicosatetranoico el cual se correlaciona con su potencial metastásico. (Soriano et al. 1999). La vía metabólica del ácido araquidónico genera lípidos bioactivos que a su vez modulan las respuestas fisiológicas y patológicas involucradas en el crecimiento y promoción del cáncer (Chan, Geraci, and Bunn 1998). LOX (lipooxigenasa) genera varios hidroperóxidos el cuál tiende a producir invasión y metástasis (Moody et al. 1998) (Rioux and Castonguay 1998). En cuanto a COX-1 y COX-2 es bien sabido que generan prostaglandinas y troboxanos. Sin embargo COX-1 es una enzima constitutiva presente en la mayoría de las células, mientras que COX-2 es inducible y es a menudo sobrerregulado en tumores (Wolff et al. 1998). Actualmente se administran diversos tratamientos para cáncer de pulmón entre los cuales se incluyen inhibidores de COX-2 y LOX, tales como sulindaco o exisulind, en combinación con quimioterapia como el cisplano (Rioux and Castonguay 1998). Existe otro tipo de terapias con imatinib, que es un análogo de ATP de tal manera que inhibe la tirosin quinasa BCR-ABL (Zhang et al. 2003). El uso de flavonoides como silibinin, se ha demostrado que induce inhibición en el crecimiento, arresto en el ciclo celular y muerte celular apoptótica en la línea celular A549 (Chittezhath et al. 2008).

## **Melanoma**

Una de las principales características que presenta el melanoma es su capacidad invasiva y metástasis, y es por ello que es un reto al momento de elegir la terapia adecuada. El comprender los mecanismo por los cuales se lleva a cabo éste proceso de invasión y metástasis nos ayuda a combatir éste tipo de cáncer (Parhar et al. 1995). Se han encontrado genes involucrados en la progresión de melanoma; uno de ellos es el gen nm23 o NME el cual codifica para una enzima nucleósido difosfato quinasa, importante en la señalización durante la diferenciación celular, proliferación y apoptosis. Sin embargo; se ha visto que esta enzima es de tipo tejido específico, ya que en algunos tipos de cáncer se encuentra sobreexpresada, y en otros tipos de cáncer se encuentra muy poca expresión (Tee et al. 2006). Otro grupo de enzimas importantes para la progresión del cáncer son las metaloproteinasas de matriz, siendo una familia de proteinasas zinc-dependientes

involucradas en la degradación de matriz extracelular, y se encuentran sobreexpresadas en procesos malignos (Hidalgo and Eckhardt 2001). Los agentes quimioterapéuticos siguen siendo parte del tratamiento contra cáncer, en el caso de melanoma se han probado diversos agentes alquilantes como dacarbazina, taxanos como paclitaxel y temozolomida (Lee, Betticher, and Thatcher 1995) (W. Sun and Schuchter 2001).

### **Cáncer de hígado**

La etiología del cáncer de hígado se debe a diversos factores, incluyendo infección con virus de hepatitis B y C, exposición prolongada a aflatoxina B1, cirrosis alcohólica y cirrosis de hígado graso. Las principales opciones terapéuticas son resección quirúrgica (Takayama et al. 1998) y trasplante (Poon and Fan 2004). También existe la opción de usar quimioterapia con sorafenib, un inhibidor de la vía de las MAP quinasas (Nair et al. 2014). Se han encontrado factores de crecimiento, vías de transducción de señales y varios agentes moleculares en el tratamiento de cáncer de hígado. Se ha visto que el sorafenib inhibe quinasas como Raf, el receptor factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y receptor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Inhibe la proliferación y angiogénesis de tumor e incrementa el grado de apoptosis en modelos tumorales (Wilhelm et al. 2004) (Liu et al. 2006) (Chang et al. 2007) (Furuse 2008).

### **Cáncer de colon**

El tratamiento convencional para el cáncer de colon es 5-Fluorouracilo (5FU) en combinación con oxaliplatino o irinotecan (Weitz et al. 2005). Sin embargo, una de las principales desventajas en el tratamiento con quimioterapéuticos es la resistencia a éstos por parte del cáncer (Touil et al. 2014). El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) es una glicoproteína transmembranal involucrada en vías de crecimiento celular, diferenciación y proliferación. La sobre-expresión de este EGFr esta correlacionada con procesos malignos. El EGFr esta compuesto de una región de unión a ligando extracelular, una secuencia lipofílica transmembrana y un dominio intracelular de tirosin quinasa dependiente de ATP. Cetuximab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el sitio de unión de ligando del receptor del factor de crecimiento epidermal (Saltz et al. 2004).

### **Cáncer de mama**



El factor de crecimiento epidermal (EGF por sus siglas en inglés) tiene gran importancia en la estimulación de células epiteliales normales y malignas, debido a que en condiciones fisiológicas como el embarazo o condiciones externas como administración de esteroides son éstas las que alteran drásticamente el crecimiento de glándulas mamarias y esto puede conducir al desarrollo de cáncer (C. K. Osborne et al. 1980). El factor de crecimiento epidermal (EGF) está relacionado con la familia de receptores ErbB, siendo HER2/neu (ErbB-2) uno de los más importantes en cáncer de mama debido a la sobre-expresión. El receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR por sus siglas en inglés) HER2/neu juega un papel importante en el crecimiento y progresión del cáncer como se mencionó anteriormente (Garcia, Franklin, and McCubrey 2006). Uno de los principales problemas en pacientes con cáncer de mama es la resistencia a quimioterapéuticos, debido a que el desarrollo de éste tipo de cáncer es por la sobreproducción de estrógeno (Moerkens et al. 2014). Las principales terapias para combatir este tipo de cáncer son la administración de agentes bloqueadores del receptor HER2/neu, tales como el tamoxifeno ya que posee efecto antagónico al unirse a este receptor, sin embargo se ha encontrado que las células de cáncer de mama son resistentes a éste tratamiento y existe regresión de la enfermedad (Benz et al. 1992) (Wiebe et al. 1993)(C. Kent Osborne et al. 2003)(Dorssers et al. 2012).

### **Efectos adversos de quimioterapia**

Los efectos secundarios varían de acuerdo al tipo de tratamiento que se administre. En el caso de dacarbazina generalmente es bien tolerada, pero los efectos que mayormente se presentan son náuseas y vómito. También es evidente la mielosupresión debido a la dosis administrada y por último el síndrome de tipo gripe y mialgias. En el caso de los taxanos se presentan reacciones de hipersensibilidad, acumulación de fluido en pleura o periferia, neutropenia, alopecia, mialgias y neuropatía periférica (Weijing Sun and Schuchter 2001). El cisplatino es una de las drogas quimioterapéuticas que más se emplea en un amplio espectro de tipos de cáncer, sin embargo la toxicidad que provoca en los pacientes la hace difícil de administrar y los efectos secundarios incluyen daño celular, náusea, vómitos, mielosupresión, inmunosupresión, nefrotoxicidad, neurotoxicidad y pérdida de audición (Rajeswaran et al. 2008) (Florea and Büsselberg 2011) (Ciarimboli 2014). La quimioterapia como tal no es la única en comprometer el estado de los pacientes, la cirugía y radioterapia

inducen el decremento de linfocitos T de tipo CD4/CD25, siendo éstas células del sistema inmunológico importantes para suprimir el cáncer (Lissoni et al. 2009).

Debido a los efectos adversos anteriormente mencionados que ocasionan la quimioterapia, radioterapia y cirugía para tratar el cáncer, se propone el EDLb como adyuvante en la terapia de este padecimiento ya que estudios recientes indican que éste proporciona protección a células del sistema inmune, con esto el estado de los pacientes no se ve comprometido al momento de estar recibiendo el tratamiento y por consecuencia los pacientes mejoran su calidad de vida (Coronado-Cerda, Franco-Molina, Armides, et al. 2016).

## **Inflamación**

La inflamación es una respuesta adaptativa que puede ser desencadenada por diversos estímulos y condiciones, tales como infección y daño tisular. Esta respuesta por agentes bacterianos se desencadena por receptores del sistema inmune innato, como receptores tipo toll (TLR's) y receptores tipo unión de nucleótido de dominio de proteína (NLR's) este reconocimiento inicial de infección es mediado por células residentes de tejido como macrófagos o mastocitos, permitiendo la producción una variedad de mediadores inflamatorios, incluyendo a las citocinas, quimocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y cascadas de productos proteolíticos (Medshitov Ruslav 2008).

### **1.1.7. Enfermedades inflamatorias**





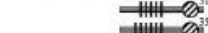




La artritis reumatoide es una enfermedad crónica inflamatoria en la que afecta las uniones sinoviales, causando dolor, hinchazón, rigidez y con esto pérdida de función de la extremidad (Paul Emery 2006). Otro tipo de enfermedades inflamatorias más comunes son aquellas de sistema gastrointestinal, siendo gastritis, colitis y enfermedad de Crohn las más comunes. En el caso de éstos padecimientos se caracterizan por dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal y malnutrición. Estas enfermedades están altamente asociadas con riesgo en desarrollo de cáncer de colon, debido a la inflamación crónica (Ahluwalia 2012). Tanto en artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias gastrointestinales tiene en común la presencia de citocinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF),


interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-1 (IL-1) (Verhoef et al. 2001) (Michlewska et al. 2009) (Ahluwalia 2012).

### 1.1.8. Activación de NFκB en la respuesta inmune e inflamatoria

La respuesta inflamatoria es caracterizada por la activación de varias vías de señalización que regulan la expresión de mediadores pro y anti-inflamatorios (T. Lawrence 2009). El NFκB, es un factor de transcripción que sirve como un regulador importante en la respuesta inmune e inflamatoria. Además está involucrado en la protección de células que están en muerte celular por apoptosis en respuesta a daño en DNA (Yamamoto and Gaynor 2001). La familia de NFκB/Rel incluye NFκB1 (p50/p105), NFκB2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, y c-Rel (ver tabla 3) (Chen et al. 1999)

Tabla 3. Miembros de la familia NFκB en mamíferos.

Protein	Mass, kDa	Genes	Structure	Knockout phenotype
p65 (RelA)	65	<i>relA</i>		Embryonic death
RelB	66	<i>relB</i>		Thymic atrophy
c-Rel	68	<i>c-rel</i>		Reduced cytokine production from T cell and macrophage
p50/p105	50/105	<i>nfkb1</i>		Compromised B-cell reaction
p52/p100	52/100	<i>nfkb2</i>		Compromised B-cell reaction
IκBα	37	<i>med-3</i>		Multifocal inflammation
IκBβ	41	<i>ikbb</i>		Not determined
IκBε	45	<i>ikbe</i>		Not determined
Bcl3	45	<i>bcl3</i>		Deficiency in humoral response



RHD, Rel-homology domain.  
 NLS, nuclear localization signal.  
 TA, transactivation domain.  
 ARD, ankyrin repeat domain.  
 PEST, proline, glutamic acid, serine, and threonine domain.

(Chen et al. 1999).

El estímulo del factor de transcripción juega un papel importante para que las células respondan y se adapten a cambios ambientales, procesos cruciales para supervivencia. En infecciones virales y bacterianas el NFκB se activa por medio de receptor tipo toll, citocinas inflamatorias (TNFα e IL-1). NFκB actúa como mediador central en respuesta inmune e inflamatoria, y está involucrado en respuesta a estrés, regulación de proliferación celular y apoptosis. Los respectivos genes blanco de NFκB permite al organismo responder efectivamente a esos cambios ambientales (ver Figura 6) (Oeckinghaus and Ghosh 2009).

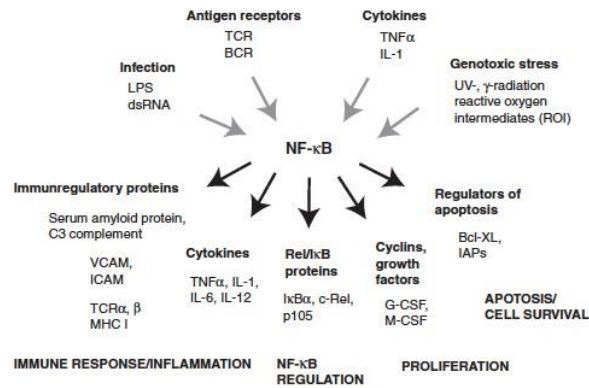


Figura 6. Estímulo de NFκB y genes blanco. NFκB actúa como mediador central en respuesta inmune e inflamatoria, y está involucrado en respuesta a estrés, regulación de proliferación celular y apoptosis. Los respectivos genes blanco de NFκB permite al organismo responder efectivamente a esos cambios ambientales. Ejemplos representativos de inductores de NFκB y genes blanco dependiente de κB (Oeckinghaus and Ghosh 2009).

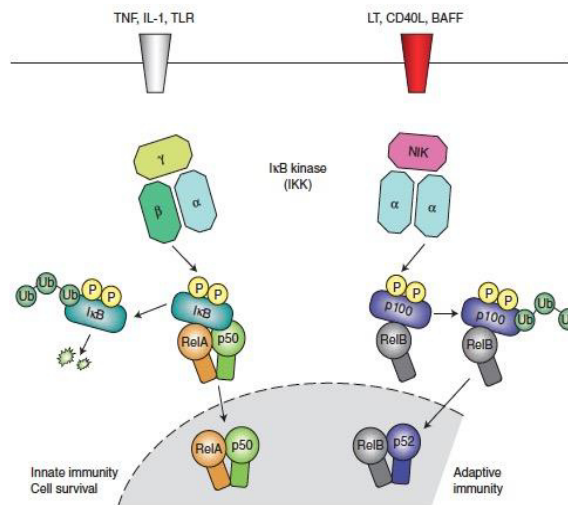


Figura 7. Vía clásica y alternativa de NFκB. El diagrama ilustra las vías de activación de NFκB, canónica y alternativa. La vía canónica es desencadenada por receptores tipo toll (TLRs) y citocinas pro-inflamatorias como TNFα, IL-1, permitiendo la activación de RelA que regula la expresión de genes proinflamatorios y supervivencia. La vía alternativa de NFκB es activada por LTβ, CD40L, BAFF, and RANKL, pero no TNFα, y resulta en la activación del complejo RelB/p52. La activación de la vía alternativa regula genes requeridos para organogénesis linfóide y activación de linfocitos B. Estas vías se caracterizan por el requerimiento diferencial de subunidad IKK. IKKβ regula la activación de la vía canónica a través de la fosforilación de IκBs y requiere de la subunidad de IKKγ pero no de IKKα, mientras que IKKα es requerido para la activación de la vía alternativa a través de la fosforilación y procesamiento de p100, el precursor de p52, pero este es independiente de IKKβ y IKKγ (T. Lawrence 2009).

### **1.1.9. Citocinas involucradas en inflamación**

Las citocinas son moléculas secretadas por células del sistema inmune las cuáles poseen diferentes funciones tales como activación, diferenciación y crecimiento que a su vez regulan y determinan las respuestas inmunes, dependiendo del tipo de citocina que se secreta será la actividad que tenga en el organismo, algunas poseen actividad pro-inflamatoria, mientras que otras anti-inflamatoria (Borish and Steinke 2003).

#### **Interleucina-1 (IL-1)**

La familia de interleucina-1 esta representada por cuatro péptidos (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y receptor antagónico de IL-1, IL-1ra e IL-18). Entre las actividades biológicas más importantes que presenta la IL-1 es su capacidad de activar linfocitos T potenciando la producción de IL-2 y la expresión de receptores de IL-2. En ausencia de IL-1 disminuye la respuesta inmune o desarrolla un estado de tolerancia. También la IL-1 promueve la proliferación de linfocitos B y aumenta la síntesis de inmunoglobulinas. La IL-1 interactúa en el sistema nervioso central para producir fiebre, letargia, sueño y anorexia (Borish and Steinke 2003). Tanto la IL-1 $\alpha$  como IL-1 $\beta$  desencadenan fiebre potenciando la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) por parte del endotelio vascular del hipotálamo (Feghali and Wright 1997).

#### **Interleucina-6 (IL-6)**

La interleucina-6 es una glicoproteína de 21 a 28 kDa dependiendo del grado de modificaciones post-transduccional. Las células mononucleares fagocíticas son la principal fuente de IL-6 pero también son producidas por linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, hepatocitos y células de médula ósea. La IL-6 es un mediador en la activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos T. Al igual que IL-1 induce pirexia y producción de proteínas de fase aguda. (Borish and Steinke 2003). Actúa como factor de crecimiento para linfocitos B maduros e induce su maduración final a células plasmáticas. La interleucina 6 es una citocina que posee actividad tanto anti-inflamatoria como pro-inflamatoria (Scheller et al. 2011). En cuanto a su actividad anti-inflamatoria es debido a que inhibe la producción de TNF, proporcionando una retroalimentación negativa para limitar la respuesta inflamatoria aguda (Feghali and Wright 1997).

### **Interleucina-10 (IL-10)**

La interleucina-10 es un factor de crecimiento de linfocitos T derivadas de linfocitos B producida por linfocitos  $T_H1$  y  $T_H2$ , linfocitos T citotóxicos, linfocitos B, mastocitos, células fagocíticas mononucleares. La IL-10 inhibe la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 por linfocitos  $T_H1$ ; IL-4 e IL-5 por linfocitos  $T_H2$ ; IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  por fagocitos mononucleares; e IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células natural killer. También la IL-10 inhibe las moléculas del MHC de clase II (Borish and Steinke 2003).

### **Interleucina-12 (IL-12)**

Esta interleucina es derivada de monocitos y macrófagos pero también de linfocitos B, células denticíticas, células de Langerhans, neutrófilos polimorfonucleares y mastocitos. La IL-12 activa e induce la proliferación, citotoxicidad, y producción de citocinas de las natural killer. También promueve la proliferación de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos (Borish and Steinke 2003).

### **Proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)**

Las quimiocinas son un grupo pequeño de moléculas (8 a 12 kDa) capaces de inducir quimotaxis en una variedad de células incluyendo neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos, fibroblastos y queratinocitos. Estas moléculas regulan su actividad a través de interacciones con miembros de la superfamilia transmembrana-7, receptor acoplado a proteína-G. Las quimiocinas se dividen en cuatro familias, basándose en la posición de los residuos de cisteína en el extremo N-terminal. La subfamilia C-C, los residuos de cisteína están adyacentes uno con otro. La proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o CCL2) puede inhibir la producción de IL-12 de células presentadoras de antígeno y potenciar la producción de IL-4 de linfocitos T activados, que conduce a un fenotipo de linfocitos  $T_H2$  (Borish and Steinke 2003).

### **Interleucina-8 (IL-8)**

El quimioatrayente más importante para PMNs, CXCL8 (IL-8) es derivado principalmente de fagocitos mononucleares, células endoteliales y epiteliales pero también de linfocitos T,

eosinófilos, neutrófilos, fibroblastos, queratinocitos y hepatocitos. La síntesis de CXCL8 puede ser inducida por LPS, IL-1, TNF y virus. Es uno de los quimioatrayentes más potentes para neutrófilos y también estimula la desgranulación de éstos, adherencia de células endoteliales por CD11b/CD18. Durante la respuesta inflamatoria esta aparece tarde en comparación con otros quimioatrayentes (Borish and Steinke 2003). La IL-8, IL-1 y TNF reclutan a los neutrófilos mediante la regulación en la expresión de moléculas de adhesión de la superficie celular (molécula de adhesión endotelial de leucocitos, ELAM-1, y la molécula de adhesión intracelular, ICAM-1) por lo tanto potencia la adherencia de neutrófilos en las células endoteliales (Feghali and Wright 1997).

### **Factor de necrosis tumoral (TNF)**

Existen dos proteínas homólogas de factor de necrosis tumoral, una es derivada de fagocitos mononucleares (TNF- $\alpha$ ) y linfocitos (TNF- $\beta$ ). TNF- $\alpha$  puede ser producido por neutrófilos, linfocitos activados, natural killer, células endoteliales y mastocitos. El inductor más potente de TNF por monocitos es el lipopolisacárido (LPS), actuando a través del receptor tipo toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4) (Borish and Steinke 2003). El TNF- $\alpha$  al igual que IL-1 inducen fiebre por la síntesis de PGE<sub>2</sub> en el endotelio vascular del hipotálamo, o indirectamente induciendo la liberación de IL-1. Ambas citocinas pueden estimular la producción de colagenasa y PGE<sub>2</sub> en células sinoviales y así es como contribuyen al daño en las articulaciones como en la artritis reumatoide (Feghali and Wright 1997).

### **Interferón (IFN)**

Existen tres miembros en la familia de interferón ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), su nomenclatura está basada en su habilidad para “interferir” en el crecimiento viral. IFN- $\alpha$  deriva principalmente de monocitos, macrófagos, linfocitos B, y natural killer. La actividad antiviral se debe a la inhibición de la replicación del virus en células infectadas, protegiendo a las células no infectadas, y estimula la inmunidad antiviral por los linfocitos T y las natural killer. IFN- $\alpha$  también regula las moléculas del MHC de clase I y como mediador en la actividad antitumoral. El IFN- $\beta$  posee actividades similares que IFN- $\alpha$ , mientras que el IFN- $\gamma$  posee actividad antiviral moderada y deriva principalmente de linfocitos T (Borish and Steinke 2003).

En la Figura 8 se muestran las citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria aguda, siendo principalmente IL-8; y en la respuesta inflamatoria crónica IL-10, IL-12, IFN- $\alpha$  Y TNF- $\beta$ ; en el caso de IL-6, IL-1 TNF- $\alpha$  actúan tanto procesos inflamatorios agudos y crónicos.

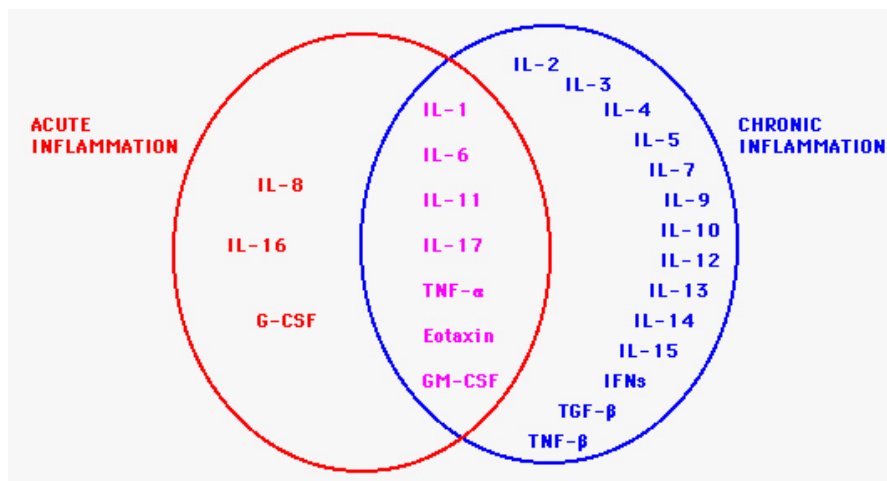


Figura 8. Citocinas involucradas en respuesta inflamatoria aguda y crónica.

#### 1.1.10. Tratamiento convencional en procesos inflamatorios

El tratamiento convencional para los procesos inflamatorios son los anti-inflamatorios no esteroideos. El principal motivo de emplear estas drogas es debido a que inhiben ciclooxigenasa, reduciendo la producción de prostaglandinas, sin embargo sólo disminuye los síntomas pero no actúa en el daño estructural que ocasiona en el caso de artritis reumatoide (Paul Emery 2006) (P. Emery and Dörner 2011).

Para el tratamiento de artritis reumatoide estan los analgésicos, los cuales incluyen todos los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) pero el más empleado es el acetaminofén, sin embargo, este puede ocasionar daño hepático.

Otro tipo de tratamiento son modificadores de respuesta biológica, en los que se emplean virus modificados genéticamente, genes o proteínas, esto como estimulante de la respuesta natural del cuerpo.



Los corticoesteroides son altamente empleados ya que mimetizan los efectos del cortisol, hormona que es producida naturalmente en el organismo en las glándulas adrenales, sin embargo tiende a producir glucosa, hay un alto riesgo de tromboembolismo venoso y provoca deficiencia de vitamina D.

Los fármacos antireumáticos modificadores de enfermedad (DMARDs por sus siglas en inglés, disease-modifying antirheumatic drugs) tales como el metotrexato es uno de los más empleados para artritis reumatoide y uno de los más seguros, sin embargo es un bloqueador del folato, es por ello que se debe administrar ácido fólico en conjunto.

### **Efectos adversos**

Entre las drogas que se empleaban comúnmente en artritis reumatoide eran oro, penicilamina y sulfasalazina, sin embargo la respuesta era baja y provocaban una alta toxicidad (Paul Emery 2006). El tratamiento para procesos inflamatorios ya sea para artritis reumatoide o a nivel intestinal, son los anti-inflamatorios no esteroides (AINE's) debido a que inhibe la actividad de las ciclooxigenasas (COX) y de ésta manera disminuye la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, por lo que la inflamación, fiebre y dolor disminuyen (Stevenson 1984). Sin embargo, entre los efectos secundarios que poseen estos medicamentos son principalmente a nivel intestinal, ya que provocan daños en la mucosa, tales como úlceras, hemorragias, irritación e inflamación (I et al. 1993) (Singh G et al. 1996). En pacientes con artritis reumatoide se vio que con el uso de misoprostol reducía estos efectos adversos causados por AINEs (Silverstein et al. 1995).

### **Inmunoterapia**

La inmunoterapia se basa en emplear el sistema inmunológico como herramienta para el tratamiento de diversos padecimientos, los mecanismos moleculares y celulares para controlar el sistema inmunológico han creado una alternativa al tratamiento de cáncer y de enfermedades inflamatorias (Durant 1987) (Jaffee 1999) (Borghaei, Smith, and Campbell 2009). Durante décadas se han empleado fármacos quimioterapéuticos y radiación ionizante para eliminar el cáncer, sin embargo, estos ocasionan efectos adversos graves a los pacientes debido a la alta citotoxicidad y baja especificidad que presentan, además que en

muchos casos se produce resistencia por parte del tumor (Rajeswaran et al. 2008) (Borghaei, Smith, and Campbell 2009) (Florea and Büsselberg 2011) (Ciarimboli 2014). En la Figura 9, se muestran las células del sistema inmune innato y adaptativo involucradas en la respuesta frente a tumores, en el caso de las células del sistema innato son de repuesta temprana por la liberación de citocinas para el lisado de células anormales (células NK), captación de restos de células muertas (mococitos, macrófagos y células dendríticas) para presentación de antígeno a linfocitos T mediante el MHC. En la respuesta adaptativa, los linfocitos T y B, generan respuestas antígeno-específicas, al expresar receptores antígeno-específicos la proliferación y diferenciación celular genera células efectoras activadas y de esta manera tendremos células del propio sistema del individuo capaz de actuar contra células transformadas (Borghaei, Smith, and Campbell 2009) (Restifo, Dudley, and Rosenberg 2012).

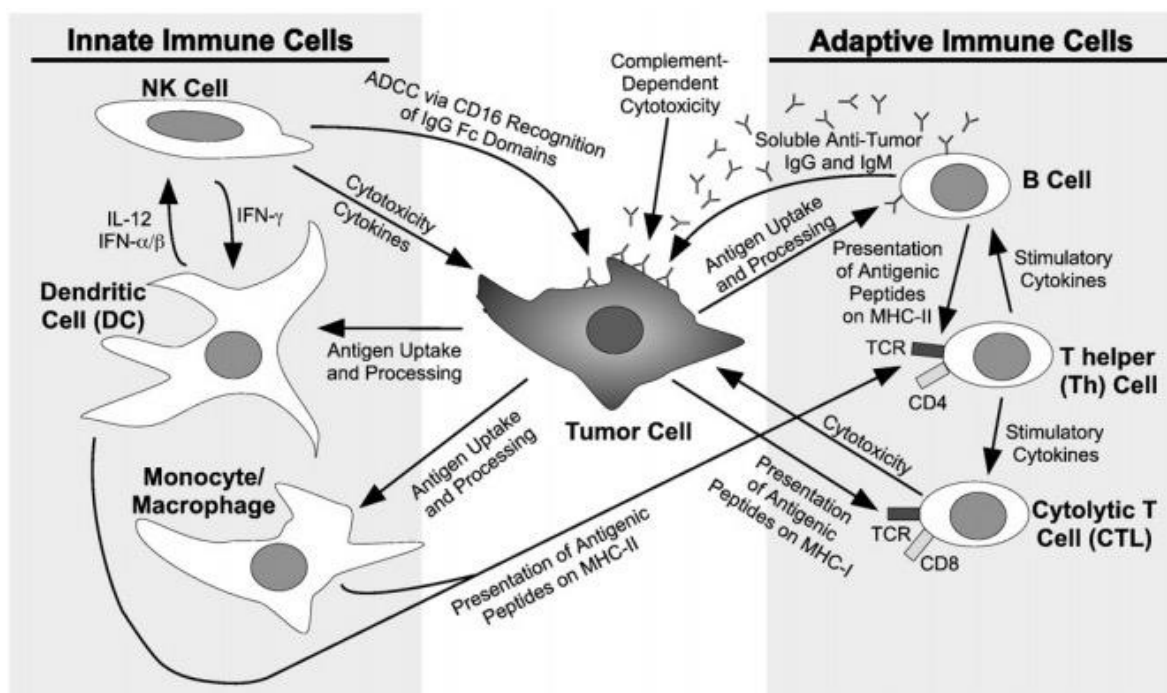


Figura 9. Células del sistema inmune y sus función en respuesta a células tumorales

Para procesos inflamatorios también se han empleado tratamientos con anticuerpos monoclonales que van dirigidos a moléculas pro-inflamatorias, en la Tabla 4 se muestran los tipos de anticuerpos que se emplean en estos padecimientos (Ahluwalia 2012).

Tabla 4. Agentes inmunológicos en enfermedades inflamatorias intestinales

Moléculas blanco	Anticuerpo	Modo de administración	Enfermedad	Aprobada por la FDA	Referencias
<b>TNF</b>	Infliximab	IV	EC, CU	+	(Targan et al. 1997) (Hanauer et al. 2002) (Rutgeerts et al. 2005)
<b>TNF</b>	Adalimumab	SC	EC, CU	+ (EC)	(Hanauer et al. 2006)
<b>TNF</b>	Certolizumab	SC	EC	+	(Schreiber et al. 2005) (Sandborn et al. 2007) (Sandborn et al. 2011)
<b>IL-6</b>	Tocilizumab (MRA)	IV	EC	-	(Ito et al. 2004)
<b>P40 de IL- 12/IL23</b>	Briakinumab (ABT-874) y Ustekinumab	IV o SC	EC	-	(Elliott et al. 2009) (Mannon et al. 2004) (Toedter et al. 2009) (Sandborn et al. 2008)

Abreviaciones: IV, intravenosa; SC, subcutáneo; EC, enfermedad de Crohn; CU, colitis ulcerativa

Debido a que el TNF juega un papel importante en cuanto a la patogénesis de la artritis reumatoide, uno de los tratamientos propuestos fue el empleo de anticuerpos para bloquear esta citocina y con esto disminuir los signos y síntomas, además inhibe daños estructurales ocasionados por esta enfermedad, el anticuerpo mayormente empleado es infliximab al igual que en el tratamiento para enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa (Targan et al. 1997)(Hanauer et al. 2002) (Rutgeerts et al. 2005) (Paul Emery 2006).

### **Extracto dializable de leucocitos de bovino, EDLb**

El Dr. Henry Sherwood Lawrence fue quien descubrió que la inmunidad se transfería de un donador inmunocompetente a un receptor inmunocomprometido a partir de un extracto dializable de leucocitos de sangre periférica. Su trabajo lo realizó en pacientes que presentaban sensibilidad en piel a la proteína M de estreptococo y tuberculina, a partir de éstos pacientes obtuvo sangre periférica y colectó el paquete leucocitario, y mediante procedimientos que especifica en su trabajo obtuvo el extracto dializable de leucocitos (EDL), lo que observó fue que aquellos pacientes que eran incapaces de desarrollar una hipersensibilidad de tipo retardada (HTR), al momento de administrarles el EDL (H.

Sherwood Lawrence 1955). Desde el descubrimiento de que era posible transferir inmunidad mediada por células a receptores inmunocomprometidos de derivados leucocitarios ha dado paso a nuevas investigaciones en el campo de la salud, el empleo de ésta herramienta se ha llevado a cabo en infecciones, cáncer, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias y alergias como tratamiento o profilaxis para estos padecimientos (Zajícová et al. 2014) (Arnaudov and Kostova 2015). El extracto dializable de leucocitos (EDL) puede provenir de diversas fuentes biológicas ya sea bazo, sangre periférica, calostro o tejido linfoide, siendo éstos importantes en el sistema inmunológico. Actualmente el EDL que más se emplea es el que proviene de bazo de bovino, debido su actividad es independiente de especie o raza animal (Wilson et al. 1988) (M.A. Franco-Molina et al. 2006) (Krishnaveni 2013)(Merchand-Reyes et al. 2015). El EDL no es inmunogénico debido a que no es específico de especie, además de que contiene secuencias consenso de aminoácidos LLYAQDL/VEDN las cuales se unen con alta afinidad a receptores específicos de células blanco (llamados receptores de Factor de Transferencia). La región N-terminal de esos péptidos es muy similar a neuropeptidos, tales como las encefalinas (Kirkpatrick 2000) (Sánchez-González, Sosa-Luna, and Vásquez-Moctezuma 2011) (Krishnaveni 2013).

#### **1.1.11. Composición del EDLb**

El EDLb es una mezcla heterogénea de moléculas que proviene del rompimiento del paquete leucocitario y posterior a esto se realiza una diálisis para obtener moléculas que oscilan entre los 12-14 kDa de peso molecular, es producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología en la Facultad de Ciencias Biológicas es conocido comercialmente como IMMUNEPOTENT CRP<sup>MR</sup> y hasta el momento se sabe que esta constituido por aproximadamente 200 sustancias. La propiedad inmunomoduladora del EDLb se debe a la presencia de sustancias activas llamadas “factor de transferencia” (FT) y el resto de las moléculas presentes en el EDLb también poseen actividades bioquímicas e inmunológicas que complementan el efecto inmunomodulador del FT (Arnaudov and Kostova 2015). El factor de transferencia esta compuesto de moléculas de pesos molecular de 3.5-6.0 kDa a los cuales los oligoribonucleótidos se unen (Sánchez-González, Sosa-Luna, and Vásquez-Moctezuma 2011). Además del FT, el EDL también contiene nucleótidos cíclicos, ascorbato, prostaglandinas, histamina, serotonina, nicotinamida,

algunos aminoácidos y bases púricas (Klesius, Fudenberg, and Smith 1980). El EDLb es una preparación libre de pirógenos, líquido amarillo claro con pH de 5.5-7.0 dependiendo del tipo de método de obtención (Krishnaveni 2013).

#### **1.1.12. Mecanismo de acción**

El factor de transferencia proviene de linfocitos CD4<sup>+</sup>Th1 durante la respuesta inmune a un antígeno (H. S. Lawrence and Borkowsky 1996) (Krishnaveni 2013). La actividad biológica incluye diferentes efectos, en algunas ocasiones lo opuesto. Contiene los siguientes constituyentes: inductor o supresor de antígeno específico y componentes no específicos (tipo adyuvante) (A. A. Gottlieb et al. 1980). En el extracto se han encontrado fracciones con actividad hematopoyética (Vacek et al. 2002), actividad antibacterial *in vitro* (Moisés Armides Franco-Molina et al. 2006), actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer (M.A. Franco-Molina et al. 2006) y recientemente se encontró efecto quimioprotector en células de médula ósea en modelo *in vivo* de murinos (Coronado-Cerda, Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, et al. 2016). Los componentes antígeno-específico son moléculas con información involucradas en el reconocimiento inmune de antígenos que han entrado al cuerpo y en la formación de memoria inmunológica. Las fracciones inductoras potencian estímulo antigénico, el cual provoca la producción de IFN- $\gamma$ , Il-2 y TNF- $\alpha$  por las células CD4<sup>+</sup>Th1 (Krishnaveni 2013). Según Ojeda y colaboradores la producción de TNF- $\alpha$ , Il-6 e Il-8 está asociado con la expresión del receptor TLR2 y TLR4 y el potenciador de la cadena ligera del NF $\kappa$ B y actividad de la adenosina monofosfato (Ojeda et al. 2005). Franco Molina y colaboradores, propusieron un modelo sobre el mecanismo de acción del EDLb sobre la modulación de citocinas, en el cual explican que posiblemente su actividad anti-inflamatoria y antioxidante sea a través de la modulación de la vía de señalización I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B, en el cual al momento de haber un estímulo en este caso lipopolisacárido (LPS) activa la vía de señalización NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B, el modo de acción es impedir la activación de I $\kappa$ B por tal motivo no se lleva a cabo la transcripción de ciclooxigenasa 2 (COX-2) y óxido nítrico (NO), por el contrario se transcriben superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), siendo estos antioxidantes endógenos que reparan y previenen el daño causado por radicales libres (NO, COX-2 y prostaglandinas) (ver Figura 10) (Moisés A. Franco-Molina 2011).

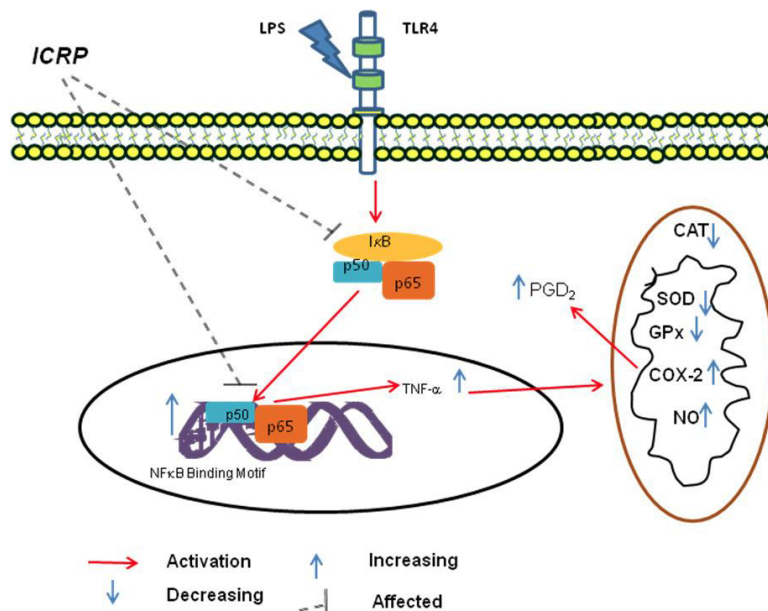


Figura 10. Modelo hipotético del mecanismo de acción del EDLb en la modulación de citocinas.

### 1.1.13. Actividad antitumoral del extracto dializable de leucocitos (EDL)

Pineda y colaboradores reportaron que el uso de EDL en pacientes con glioma, el tamaño del tumor reducía significativamente, incrementaba el conteo de linfocitos CD2+, CD4+, CD8+ y natural killer; además aumentaba el porcentaje de células tumorales apoptóticas. En este estudio se demostró que la combinación de el extracto con quimioterapia tenía efecto sinérgico (Pineda et al. 2005)

En investigaciones *in vitro* se observa que el extracto dializable de leucocitos de bovino (EDLb) tiene actividad citotóxica en células de cáncer. En el caso de la línea celular MCF-7 que proviene de cáncer de mama, el EDLb induce supresión de algunas proteínas apoptóticas (TP53, Bag-1, c-Myc, Bax, Bcl-2 and Bad) (M.A. Franco-Molina et al. 2006).

Uno de los primeros estudios clínicos contra cáncer empleando factor de transferencia lo realizó Fudenberg, observando que el extracto producía citotoxicidad mediada por células (Fudenberg 1976). En el caso de cáncer de próstata se trataron con el EDL a pacientes que no respondieron al tratamiento convencional, obteniendo resultados benéficos para el 44% de los pacientes (Pizza et al. 1996). También en pacientes con cáncer de pulmón tratados con el EDLb obtuvieron resultados benéficos, incrementando la supervivencia y

mejorando la calidad de vida de los pacientes (Pilotti et al. 1996). Franco Molina y colaboradores comprobaron que el uso del EDLb en cáncer de pulmón incrementaba las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup>, manteniendo la hipersensibilidad de tipo retardada e incrementando la calidad de vida de los pacientes, así como disminución de los efectos adversos de la quimioterapia (M. A. Franco-Molina et al. 2008).

#### **1.1.14. Otros usos del EDLb**

Debido a que el EDLb modula la vía de señalización NF-κB, este puede ser empleado en numerosos tipos de enfermedades, en este caso en síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) provocada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Lara et al. 2011). El primer reporte sobre la actividad inmunomoduladora en SIDA se realizó con factor de transferencia específico de VIH de murino en pacientes infectados y el resultado fue que se restauró su reactividad de pruebas en piel y un moderado incremento de conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estudios similares se observaron en pacientes con SIDA y tratados con factor de transferencia no específico de VIH (Carey et al. 1987) (M. S. Gottlieb et al. 1991) (A. A. Gottlieb 1991).

También se ha empleado el EDL en infecciones de otro tipo de virus como *Herpes simplex* (HSV), *Varicella zoster*, *Cytomegalovirus* (CMV) y *Epstein Barr*; y en linfoma de Hodgkin. Para el HSV se trataron pacientes con infección recurrente de herpes, promoviendo la función de linfocitos T (Khan et al. 1981).

En el caso de infección con *Varicella zoster* el factor de transferencia tiene efecto protector y terapéutico, el cual está asociado con el incremento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, niveles de IFN-γ y el rango de CD4/CD8 en comparación con pacientes que no fueron tratados con factor de transferencia (Steele, Myers, and Vincent 1980) (Bowden et al. 1985) (Estrada-Parra et al. 1998).

El factor de transferencia específico para virus de hepatitis B, mostró resultados favorables que se comprobaron con examen de biopsia, indicadores bioquímicos e inmunológicos (Roda et al. 1985)(Jain, Thomas, and Sherlock 1977).

En la tabla 4, se muestra una lista de las enfermedades que han sido tratadas con EDL y los efectos positivos que se han obtenido (Krishnaveni 2013).

Tabla 5. Enfermedades estudiadas con el factor de transferencia.

<b>Enfermedades tratadas con factor de transferencia</b>	<b>Efectos</b>	<b>Referencias</b>
<b>Osteosarcoma</b>	Incrementa citotoxicidad mediada por células	(Fudenberg 1976)
<b>Varicela con leucemia aguda en niños</b>		(Steele, Myers, and Vincent 1980)
<b>Virus de herpes simple</b>	Promueve la función de células T	(Ascher, Gottlieb, and Kirkpatrick 1976) (Khan et al. 1981). (Viza et al. 1986) (Salinas-Jazmín et al. 2015)
<b>Síndrome Wiskott- Aldrich</b>	Incrementa nivel de C3 a niveles normales, no regresión de infección, ausencia de eczema	(Levin et al. 1970)
<b>Glioma</b>	Reduce el tamaño de tumor, incrementa población de linfocitos CD2 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> y células NK.	(Pineda et al. 2005)
<b>Cáncer de próstata</b>	Altas tasas de supervivencia	(Pizza et al. 1996)
<b>Virus de inmunodeficiencia humana</b>	Incrementa niveles de linfocitos T cooperadores y T citotóxicos	(Lara et al. 2011)
<b>Cáncer de pulmón</b>	Mayor supervivencia	(Pilotti et al. 1996)
<b>Hepatitis C</b>	Estímula linfocitos Th1, los cuales ayudan a eliminar partículas virales	(Tsai et al. 1997)
<b>Candidiasis crónica mucocutánea</b>	Restablece inmunidad celular	(Masi, De Vinci, and Baricordi 1996)



## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se presentan en el mercado tratamientos inmunológicos dirigidos a luchar en contra de múltiples enfermedades. El cáncer representa una de las principales muertes a nivel mundial; en México según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2012) la tasa de morbilidad en personas menores de 20 años es causada en su mayoría por neoplasias de órganos hematopoyéticos, en cambio en personas mayores de 20 años es debido a neoplasias de órganos genitales masculinos, de mama y órganos digestivos.

El papel de la inflamación en cáncer se vio por primera vez en los años 90's, cuando observaron que los tumores a menudo se originaban en sitios de inflamación crónica, estando presentes células inflamatorias en muestras de biopsia de tumores. Estudios epidemiológicos indican que las inflamaciones crónicas predisponen a diferentes tipos de cáncer como lo son de colon, próstata e hígado.

Con las modificaciones al proceso de producción para la obtención del EDLb se pretende tener un producto con mayor actividad antitumoral, antioxidante y anti-inflamatoria.

La principal desventaja que presenta la producción clásica del EDLb es la facilidad de contaminación microbiana y gastos de producción; es por ello que se pretende mejorar el proceso de obtención de EDLb. Con esta mejora se espera disminuyan posibles fuentes de contaminación microbiológicas, costos de producción y eficiencia biológica; además de obtener nuevas formas de presentación farmacéutica como la de poder encapsular el EDLb a partir de bazo seco generando innovación al producto.

## **HIPÓTESIS**

El extracto dializable de leucocitos de bovinos (EDLb) a partir de bazo seco presenta mayor actividad anti-inflamatoria y antitumoral comparada con el EDLb clásico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Obtener EDLb a partir de bazo seco y evaluar su actividad antitumoral y anti-inflamatoria en diversas líneas celulares *in vitro*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Elaborar EDLb a partir de bazo seco.
2. Caracterización del EDLb clásico y el EDLb obtenido por el método de secado, mediante análisis de infrarrojo (IR), potencial zeta, microscopio electrónico de barrido (SEM) y difracción de rayos X.
3. Determinar si existen diferencias en el perfil bromatológico entre el EDLb clásico y el EDLb obtenido por el método de secado.
4. Determinar y comparar el efecto del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco sobre la viabilidad de las líneas celulares MCF-7, A427, B16F10, HT-29, HEPG-2, PBMC, células de médula ósea y macrófagos peritoneales murino.
5. Evaluar si los tratamientos con EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco tienen la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70) en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS.
6. Evaluar si los tratamientos con EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco, tienen la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-1 $\beta$  y IL-8 ) y óxido nítrico (NO) en células mononucleares de sangre periférica de humano estimuladas con LPS.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se emplearon ratones BALB/c de 6 semanas para obtención de células de médula ósea y macrófagos peritoneales.

El bazo de bovino empleado para los ensayos fue donado por un rastro tipo TIF de la localidad, con certificado proveniente de un hato libre de *Brucella spp.* y tuberculosis.

### **Cultivo celular**

Para los ensayos se emplearon las líneas celulares: MCF7, A427, HT-29, B16F10 y HEPG-2 (ATCC, Manassas, VA, USA), las cuales fueron cultivadas en medio RPMI y DMEM (Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá) de acuerdo a las necesidades de la línea celular y suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de una solución de penicilina-estreptomicina en una atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **1.1.15. Obtención de macrófagos peritoneales de murino**

Ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad, se sacrificaron mediante dislocación cervical, para la obtención de macrófagos peritoneales residentes, mediante lavados repetidos y recuperación de el medio de cultivo RPMI-1640 estéril a 2°C dentro de la cavidad peritoneal de el ratón, empleando jeringa con aguja estéril.

Una vez obtenidas las células, se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos, se lavaron 2 veces con medio de cultivo RPMI-1640 estéril suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de una solución de penicilina-estreptomicina en una atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **1.1.16. Obtención de células derivadas de médula ósea de murino**

Se extrajeron las células de médula ósea mediante inyección de PBS a 2°C y se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de una solución de penicilina-estreptomicina en una atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **1.1.17. Obtención de células mononucleares de sangre periférica de humano (PBMC).**

- 1) Se llevó a cabo la extracción de sangre (aproximadamente 20 mL) de un paciente sano.
- 2) Posteriormente se depositó la sangre en un tubo con capacidad de 50mL y se añadieron 20 mL de PBS 1X de modo que se obtenga una dilución 1:1.
- 3) En dos tubos por separado (capacidad de 50 mL) se depositaran 20 mL de Ficoll-Paque y 20 mL de la sangre diluida con PBS 1X.
- 4) Estos tubos serán entonces centrifugados a 1600 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Tras la centrifugación se obtendrán los leucocitos, los cuales serán sometidos a dos lavados con 20 mL de PBS 1X bajo las siguientes condiciones de centrifugación; 1600 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Tras el segundo lavado, se retirara el sobrenadante y se resuspenderá el pellet en 20 mL de PBS 1X (concentrado celular).
- 7) Se llevó a cabo el conteo celular depositando 400 µL de medio RPMI, 50 µL de colorante azul tripan y 50 µL del concentrado celular.
- 8) De la solución anterior se depositaran 10 µL en una cámara de Neubauer y se determinara el número de células por mililitro mediante el método de conteo celular por exclusión con azul de tripano.

### **Elaboración del Extracto Dializable de Leucocitos de bovino (EDLb)**

Los bazo de bovino se pesarán y se tomaran dos porciones de igual peso, para realizar el EDLb por el método clásico y el EDLb por el nuevo método, teniendo la porción “A” y la porción “B” respectivamente.

### **1.1.18. Preparación del Extracto Dializable de Leucocitos de bovino (EDLb) por el método clásico**

A la porción “A” del bazo se homogenizó con agua MiliQ y posterior a esto se realizará la diálisis con un poro de membrana de 12-14 kDa, el extracto obtenido se liofilizará en liofilizadora (TELSTAR).

La concentración final de EDLb clásico fue de 5 U/mL.

#### **1.1.19. Preparación del Extracto Dializable de Leucocitos de bovino (EDLb) a partir de bazo seco**

La porción “B” del bazo se somete a secado en un aparato de secado de alimentos, una vez secado el bazo se trituran hasta obtener un polvo fino y para realizar el dializado se homogenizará con agua MiliQ empleando una membrana con un poro de 12-14 kDa, el dializado se liofilizará empleando una liofilizadora (TELSTAR).

La concentración final de EDLb a partir de bazo seco fue de 5 U/mL.

NOTA: las condiciones de preparación del extracto deben ser asépticas, con el uso de guantes, cofia, tapabocas y bata; además de emplear material esterilizado para evitar contaminación de la materia prima.

El llenado de viales debe ser en campana de flujo laminar.

#### **Caracterización del EDLb clásico y el EDLb seco mediante análisis bromatológico, espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FT-IR), difracción de rayos X, potencial zeta y microscopía electrónica de barrido (SEM)**

#### **1.1.20. Análisis bromatológico**

Los análisis bromatológicos se realizaron por parte de la Facultad de Ciencias Químicas en la unidad de Alimentos, los parámetros analizados fueron: humedad, proteína, grasas y cenizas.

Basándose en el método de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 928.08 para porcentaje de proteína y 925.45A para porcentaje de humedad; en el caso de la determinación de porcentaje de cenizas se llevó a cabo por la norma mexicana NMX-F-607-NORMEX-2013 y para porcentaje de grasa la norma oficial mexicana NOM-086-SSA1-1994.

### **1.1.21. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FT-IR)**

La finalidad de este análisis es observar si el proceso de obtención de EDLb a partir de bazo seco provoca cambios estructurales en este y comparar los espectros obtenidos del EDLb clásico y el EDLb a partir de bazo seco.

Preparación de la muestra

- 1) El liofilizado de EDLb clásico se mezcla con KBr (bromuro de potasio) en relación 1:10 respectivamente, en un mortero
- 2) Posteriormente se procedió a realizar una pastilla fina con una prensadora.
- 3) Por último se sometió al análisis de espectroscopía de infrarrojo.

Nota: De igual manera se realizó éste procedimiento con el EDLb a partir de bazo seco.

El análisis de espectroscopía de infrarrojo se realizó en colaboración con el Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) ubicado en el Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT) de la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

### **1.1.22. Potencial zeta**

Para la preparación de la muestra, se debe escoger el diluyente adecuado para el análisis, tomando en cuenta sus propiedades físicas y químicas.

En esta caso empleamos agua desionizada, buffer de biftalato pH=4, buffer de fosfatos pH=7 y buffer de borato pH=10.

Preparación de la muestra

- 1) Pesar 0.2 g de muestra
- 2) Disolver muestra en 40 mL de agua desionizada o buffer a pH de elección.
- 3) Verificar que el equipo este limpio antes de usarlo
- 4) Usar equipo con instrucciones de fabricante

El análisis de potencial zeta se realizó en colaboración en el Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico (CINVESTAV) unidad Querétaro ubicado en el municipio de Santiago de Querétaro, Querétaro.

#### **1.1.23. Microscopio electrónico de barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido proporciona imágenes morfológicas de alta resolución (~1 nm) empleando un haz de electrones, gracias a los detectores por los que está compuesto, además de obtener imágenes superficiales también realiza análisis semicuantitativo de distribución de elementos presentes en el EDLb clásico y EDLb seco.

##### **Preparación de la muestra**

El liofilizado obtenido del EDLb a partir de bazo seco y el EDLb clásico se montó de manera uniforme sobre una cintilla adhesiva de carbono acoplada a un porta muestras del SEM y se procedió a analizar las muestras en el equipo NOVA NANOSEM 200 (FEI®).

El análisis de microscopía electrónica de barrido se realizó en colaboración con el Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) de la Universidad Autónoma de nuevo León (UANL) ubicado en el Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT) de la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

#### **1.1.24. Difracción de rayos X**

La difracción de rayos X, es una técnica empleada para el análisis estructural de compuestos sólidos que presenten redes cristalinas.

El análisis de difracción de rayos X se realizó en colaboración en el Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico (CINVESTAV) unidad Querétaro ubicado en el municipio de Santiago de Querétaro, Querétaro.



## **Determinación de viabilidad celular de líneas celulares de cáncer con tratamiento de EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco.**

### **1.1.25. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry**

Se determinó la concentración de proteínas en los diferentes extractos mediante el método de Lowry empleando un kit comercial (DC Protein Assay, Bio-Rad), y la técnica se describe brevemente a continuación:

- 1) Añadir 20  $\mu$ L de reactivo “S” a cada mL de reactivo A que serán necesarios para la ejecución.

NOTA: Si las muestras no contienen detergente, puede omitir el paso 1 y usar el reactivo A tal como fue suministrado.

- 2) Preparar de 3 - 5 diluciones de un estándar de la proteína que contiene de 0,2 mg/mL a aproximadamente 1,5 mg/mL de proteína.
- 3) Pipetear 5  $\mu$ L de estándares y muestras en una placa de microtitulación limpia y seca.
- 4) Añadir 25  $\mu$ L de reactivo A en cada pocillo.
- 5) Añadir 200  $\mu$ L de reactivo B en cada pocillo.
- 6) Después de 15 minutos, se pueden leer absorbancias a 750 nm.

### **1.1.26. Determinación de viabilidad celular mediante reducción de MTT**

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

El sustrato MTT se prepara en una solución fisiológicamente equilibrada, se añade a las células en cultivo, por lo general a una concentración final de 0,2 - 0,5 mg/mL.

Las células viables con metabolismo activo convierten MTT en un producto de formazán de color púrpura con una máxima absorción cerca de 570 nm. Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir MTT en formazan, la formación de color por lo tanto sirve como un marcador útil y conveniente de las células viables.

### Preparación de los reactivos

- 1) Disolver MTT en buffer de fosfato salino, pH = 7,4 (PBS) a una concentración de 5 mg/mL.
- 2) Filtrar la solución de MTT a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m en un recipiente estéril protegido de luz.

NOTA:

\*Guardar la solución MTT, protegido de la luz, a 4°C para uso frecuente o a -20°C para almacenamiento a largo plazo.

\*Solvente empleado para disolver los cristales de formazán puede ser dimetil sulfóxido (DMSO).

Para cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (sustancia que de antemano se conozca su poder citotóxico) y células no tratadas. Los valores de comparación se hacen sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento (IC<sub>50</sub>) en las células tratadas con los agentes específicos.

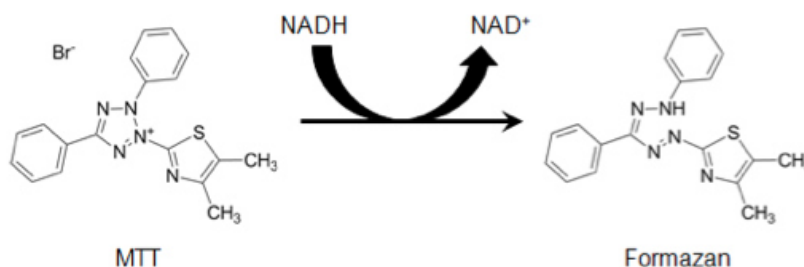


Figura 11. Estructura de MTT y producto coloreado de formazan.

### **Cultivo celular**

- 1) En placas de 96 pocillos se cultivaron 5,000 células por pozo.
- 2) Se agregó medio RPMI o DMEM, según el requerimiento de las líneas celulares, hasta un volumen final de 200  $\mu$ L.
- 3) Se incubaron durante 24 horas a 37°C a una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, hasta adherirse.

### **Administración de tratamiento con EDLb clásico en líneas celulares de cáncer**

- 1) Disolver el liofilizado del EDLb clásico en medio RPMI o DMEM, según el requerimiento de la línea celular.
- 2) Filtrar la solución de EDLb clásico a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m en un recipiente estéril.
- 3) Retirar medio de cultivo de la placa de 96 pocillos con células adheridas o en suspensión antes de administrar tratamiento.
- 4) La administración de tratamiento con EDLb clásico se realizó agregando diferentes concentraciones 0.100, 0.250, 0.500, 0.750, 1.050, 1.300, 1.550, 1.800, 2.050, 2.300 y 2.550 mg/mL.
- 5) Se incubaron durante 24 horas a 37°C a una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Administración de tratamiento con EDLb a partir de bazo seco en líneas celulares de cáncer**

- 1) Disolver el liofilizado del EDLb a partir de bazo seco en medio RPMI o DMEM, según el requerimiento de la línea celular.
- 2) Filtrar la solución de EDLb a partir de bazo seco a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m en una recipiente estéril.
- 3) La administración de tratamiento con EDLb seco se realizó agregando diferentes concentraciones 0.100, 0.250, 0.500, 0.750, 1.050, 1.300, 1.550, 1.800, 2.050, 2.300 y 2.550 mg/mL.

- 4) Se incubaron durante 24 horas a 37°C y atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

NOTA: El mismo procedimiento se usó en PBMC, macrófagos peritoneales de murino y células de médula ósea de murino.

### **Protocolo de ensayo de MTT**

- 1) Añadir 30 µL solución de MTT por pocillo para lograr una concentración final de 0,45 mg/mL.
- 2) Aforar con medio RPMI o DMEM, según el requerimiento de la línea celular, hasta 100 µL.
- 3) Incubar 1 a 4 horas a 37 ° C.
- 4) Añadir solución de solubilización (DMSO) 100 µL a cada pocillo para disolver los cristales de formazán.
- 5) Mezclar para asegurar la solubilización completa.
- 6) Leer absorbancia a 570 nm.

**Evaluar si los tratamientos con EDLb clásico y EDLb seco tienen la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70 y MCP-1) y especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS.**

Una vez obtenidos los macrófagos peritoneales de murino se sembraron en placas de 24 pozos con 5x10<sup>5</sup> células por pozo (Lida A. Beninson, 2015), a los cuáles se les indujo la activación con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) (Akira Nakamura, *et-al*, 2003).

Tabla 6. Condiciones experimentales para el ensayo de actividad anti-inflamatoria del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco en macrófagos peritoneales de murino.

LPS [mg/mL]*	EDLb clásico		EDLb a partir de bazo seco	
0	----	----	----	----
1	----	----	----	----
1	1 U/mL	----	----	----
1	----	2 U/mL	----	----
1	----	----	1 U/mL	----
1	----	----	----	2 U/mL

\*LPS (*Escherichia coli* O127:B8)

Para la determinación de citocinas pro-inflamatorias se realizó por medio de citómetro de flujo (BD Accuri) con un kit comercial (Cytometric Bead Array Mouse Inflammation, BD bioscience).

#### 1.1.27. Preparación de estándares de inflamación de ratón

- 1) Abrir vial de liofilizado de estándares de inflamación de ratón (Mouse Inflammation Standards). Transferir esferas estándar a tubo cónico y etiquetar como estándar total (Top Standard).
- 2) Reconstituir los estándares con 2.0 mL de diluyente de ensayo (Assay Diluent). Dejar reposar por al menos 15 minutos antes de realizar las diluciones.

**NOTA:** Reconstituir con pipeta. No vortex o mezclar vigorosamente.

- 3) Etiquetar tubos cónicos de 15 mL en el siguiente orden: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, y 1:256.
- 4) Pipetear 300 µL de diluyente de ensayo (Assay Diluent) en cada tubo de diluciones.
- 5) Realizar una serie de diluciones transfiriendo 300 µL del estándar total (Top Standard) al tubo de dilución 1:2 y mezclar vigorosamente. Continuar haciendo las diluciones transfiriendo 300 µL del tubo 1:2 al tubo 1:4, hasta el tubo 1:256 y mezclar vigorosamente. Preparar un tubo

que contenga diluyente de ensayo (Assay Diluent) que sirva como control negativo.

**NOTA:** Mezclar con pipeta, no vortex.

#### **1.1.28. Preparación de mezcla de perlas de captura de inflamación de ratón (Mixed Mouse Inflammation Capture Beads)**

- 1) Determinar el número de tubos a analizar (incluyendo los estándares y controles que son requeridos para el experimento).
- 2) Mezclar vigorosamente en vortex cada suspensión de perlas de captura (Capture Bead).
- 3) Añadir 10 µL de alicuota de cada perla de captura (Capture bead), para cada tubo de ensayo a analizar, en un tubo etiquetado como mezcla de perlas de captura (mixed Capture Beads), por ejemplo, 10 µL de Capture Beads de IL-6 x 18 tubos de ensayo = 180 µL de Capture Beads de IL-6.
- 4) Mezclar vigorosamente.

#### **1.1.29. Procedimiento de ensayo de CBA Mouse Inflammation**

- 1) Añadir 50 µL de la mezcla de perlas de captura (mixed Capture Beads) a los tubos a analizar.

**NOTA:** Usar vortex en la mezcla de perlas de captura (mixed Capture Beads) antes de agregar a los tubos de ensayo.

- 2) Añadir 50 µL de las diluciones estándar de inflamación de ratón (Mouse Inflammation Standard).
- 3) Añadir 50 µL de cada muestra de prueba a los tubos de ensayo muestra.
- 4) Añadir 50 µL del reactivo de detección PE de inflamación de ratón (Mouse Inflammation PE Detection Reagent) a los tubos de ensayo.
- 5) Incubar los tubos de ensayo por 2 horas y proteger de la exposición a la luz.
- 6) Añadir 1 mL de buffer de lavado (wash bufer) a cada muestra y centrifugar a 200 x g por 5 minutos.
- 7) Aspirar con cuidado y descartar el sobrenadante de cada tubo de ensayo.
- 8) Añadir 300 µL de buffer de lavado en cada tubo de análisis y

resuspender el pellet.

9) Analizar muestra en citómetro de flujo (BD Accuri).

**NOTA:** Vortex cada muestra de 3-5 segundos inmediatamente antes de analizar en citómetro de flujo.

### 1.1.30. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para este ensayo se empleo el kit ROS-ID™ Total ROS/Superoxide 51010 (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) mediante microscopía de fluorescencia.

**Evaluar si los tratamientos con EDLb clásico y EDLb seco tienen la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-1 $\beta$  y IL-8) y especies reactivas de oxígeno (ROS) en células mononucleares de sangre periférica de humano estimuladas con LPS.**

Una vez obtenidos las células mononucleares de sangre periférica de humano se sembraron en placas de 24 pozos con  $5 \times 10^5$  células por pozo (Lida A. Beninson, 2015), a los cuáles se les indujo la activación con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) (Akira Nakamura, *et-al*, 2003).

Tabla 7. Condiciones experimentales para el ensayo de actividad anti-inflamatoria del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco en células mononucleares de sangre periférica de humano.

LPS [mg/mL]*	EDLb clásico		EDLb a partir de bazo seco	
0	----	----	----	----
1	----	----	----	----
1	1 U/mL	----	----	----
1	----	2 U/mL	----	----
1	----	----	1 U/mL	----
1	----	----	----	2 U/mL

\*LPS (*Escherichia coli* O127:B8)

Para la determinación de citocinas pro-inflamatorias se realizó por medio de citometro de flujo (BD Accuri) con un kit comercial (Cytometric Bead Array Mouse Inflammation, BD bioscience).

### 1.1.31. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para este ensayo se empleo el kit ROS-ID™ Total ROS/Superoxide 51010 (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) mediante microscopía de fluorescencia siguiendo las especificaciones del inserto.

## RESULTADOS

### Caracterización del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco

#### 1.1.32. Análisis bromatológico

**Tabla 8. Determinación de análisis bromatológico del EDLb a partir de bazo seco y el EDLb clásico.**

Determinación	Valor obtenido		Método
	EDLb seco	EDLb clásico	
Proteínas (%) (%Nx6.25)	2.11	0.41	AOAC 928.08
Humedad (%)	97.44	99.32	AOAC 925.45A
Cenizas (%)	0.31	0.13	NMX-F-607-NORMEX-2013
Grasa (%)	0.14	0.14	NOM-086-SSA1-1994

La Tabla 8 muestra los porcentajes obtenidos para proteínas, humedad, cenizas y grasa del EDLb clásico y el EDLb a partir de bazo seco.

En general los porcentajes obtenidos para proteínas y cenizas fueron mayores en la muestra de EDLb de bazo seco comparada con el EDLb clásico, no se observaron cambios en los porcentajes de humedad y grasa.



### 1.1.33. Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FT-IR)

Las principales bandas de absorción obtenidas en el espectro de infrarrojo se resumen en la Tabla 9 y en la Figura 12 se muestra el espectro de infrarrojo del EDLb a partir de bazo seco (en rojo) y EDLb clásico (en negro).

Tabla 9. Principales bandas de espectro de infrarrojo del EDLb a partir de bazo seco y EDLb clásico.

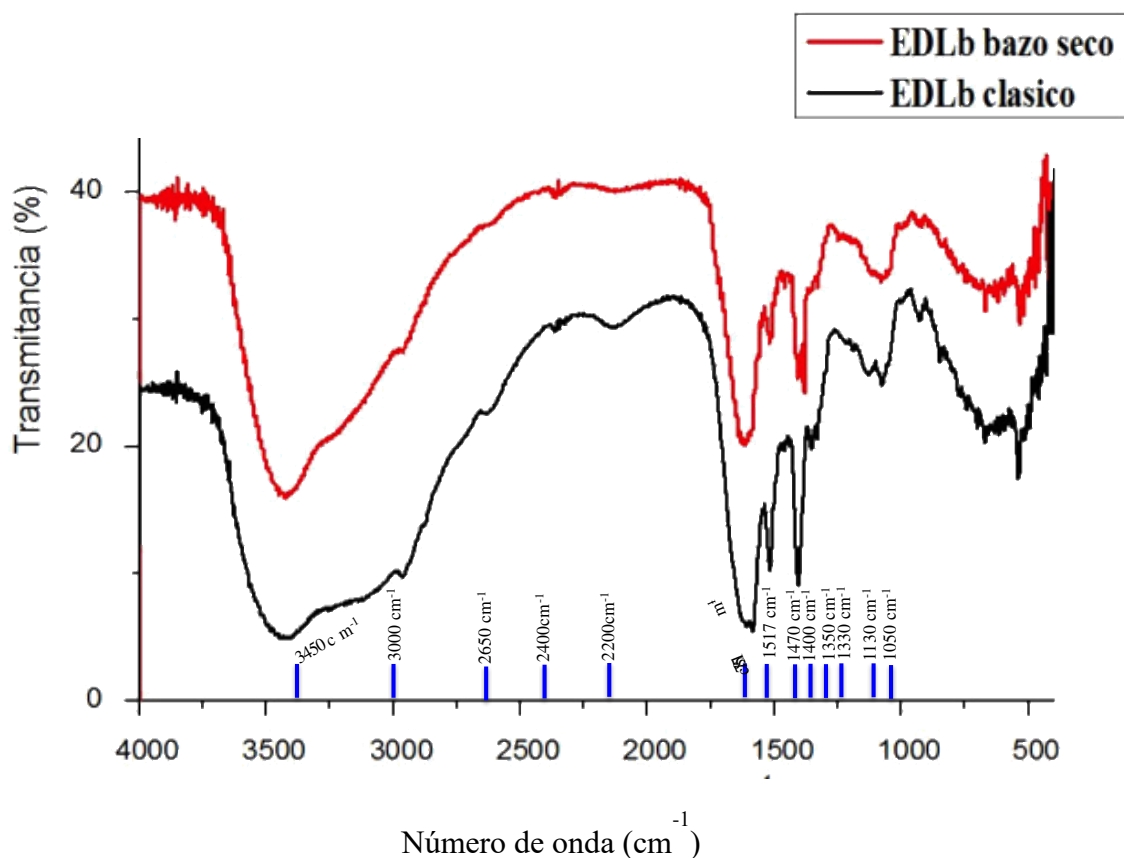
	EDLb seco	EDLb clásico
	Posición de la banda/cm <sup>-1</sup>	Posición de la banda/cm <sup>-1</sup>
<b>O-H</b>	~3450	~3450
<b>C-H, (CH<sub>3</sub>) alcano(as)</b>	3000	3000
<b>C-H (s) aldehído</b>	—	2650
<b>O=C=O</b>	2400	2400
<b>=*=(s)</b>	—	2200
<b>-COO terminal</b>	1587	1587
<b>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (s)</b>	1517	1517
<b>-C-H (v) alcano</b>	1470	1470
<b>-C-H (v)</b>	—	1400
<b>-C-H (v)</b>	—	1350
<b>C-N&lt; de amina secundaria</b>	—	1330
<b>C-O (s) alcohol secundario</b>	—	1130
<b>-C-O-C ó C-H de polisacáridos</b>	—	1050

(Arrondo et al. 1993)

(as) aymetrical stretch

(v) bending

(s) stretch



**Figura 12. Espectro de infrarrojo del EDLb a partir de bazo seco (en negro) y EDLb clásico (en rojo)**

El espectro de infrarrojo muestra bandas que aparecen tanto en el EDLb seco como en el EDLb clásico, a la longitud de onda de 3450 cm<sup>-1</sup> se observó una banda de absorción correspondiente a un enlace O-H relacionada por la presencia de moléculas de agua, otra banda importante la ubicamos a una longitud de onda de 3000 cm<sup>-1</sup> correspondiente a un enlace C-H por la presencia de grupos alcanos, a la longitud de onda de 2400 cm<sup>-1</sup> observamos que hay una banda que corresponde a la presencia de CO<sub>2</sub> ambiental, por otra parte se encuentra una banda en 1587 cm<sup>-1</sup> dando referencia a un enlace de tipo -COO, carboxilo terminal por una amida primaria y a los 1517 cm<sup>-1</sup> se observa una banda debido a un grupo amino -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, relacionada con una amida secundaria; y por último a una longitud de onda de 1470 cm<sup>-1</sup> referente a -C-H por grupo alcano.

Se notó la presencia de bandas en el espectro de infrarrojo en el EDLb clásico que no se apreciaron en el EDLb seco a las longitudes de onda siguientes, 1400 cm<sup>-1</sup>, 1350 cm<sup>-1</sup> por

enlace  $\text{C-H}$ ;  $1330\text{ cm}^{-1}$  por enlace entre  $\text{C-N}$  que se corroborará con la banda de  $1517\text{ cm}^{-1}$  de amina secundaria; otras bandas importantes fueron a longitud de onda de  $1130\text{ cm}^{-1}$  por enlace  $\text{C-O}$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$  por  $\text{C-O-C}$  por la presencia de polisacárido (ver Figura 13 y Tabla 9).

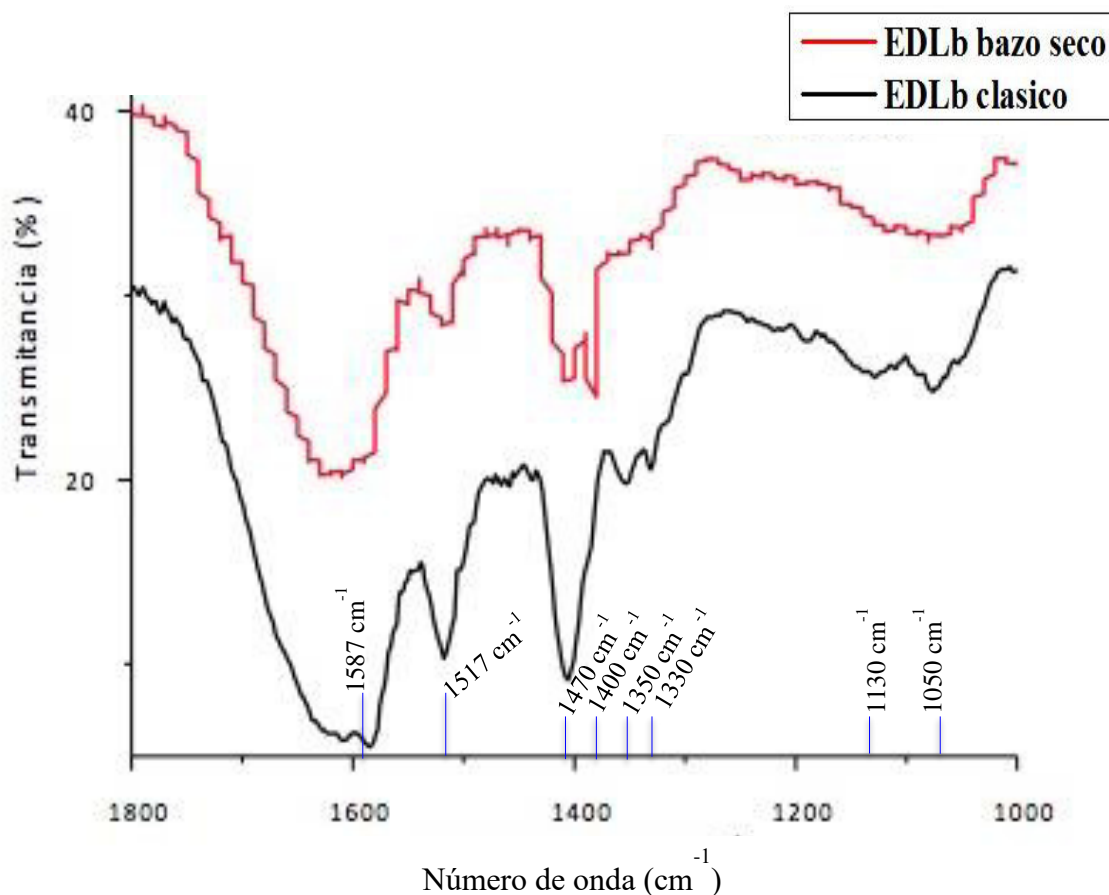


Figura 13. Zona de la huella digital en el espectro de infrarrojo del EDLb clásico (negro) y EDLb seco (rojo)

Debido a que en el EDLb clásico se observa la presencia de un mayor de bandas de enlace tipo  $\text{C-H}$  y el espectro de infrarrojo es una técnica empleada para dilucidar estructura secundaria de proteínas o péptidos se sugiere que presenta una estructura  $\alpha$ -hélice, en el caso del EDLb a partir de bazo seco debido a que no presenta éstas bandas de enlace tipo  $\text{C-H}$  se presume una estructura  $\beta$ -plegada.

### 1.1.34. Difracción de rayos X (XRD)

En la Figura 14 se puede observar el difractograma del EDLb a partir de bazo seco y el EDLb clásico

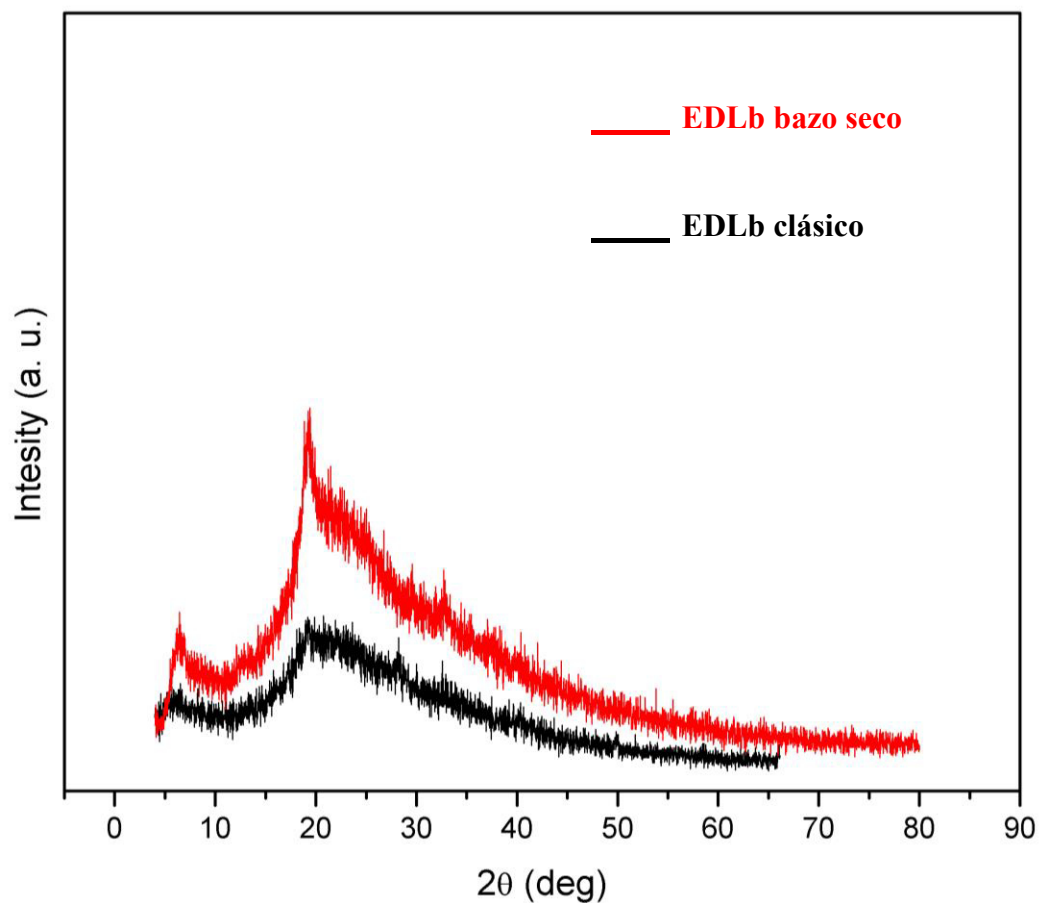


Figura 14. Difractograma de rayos X del EDLb a partir de bazo seco (rojo) y EDLb clásico (negro).

En la difracción de rayos X se relaciona el área bajo la curva con el grado de cristalinidad, de acuerdo al difractograma obtenido para EDLb clásico (en negro) y EDLb seco (en rojo), el EDLb seco presentó una cristalinidad mayor.

### 1.1.35. Potencial zeta

Se midió el potencial zeta con el fin de observar la interacción del EDLb seco y el EDLb clásico en solución dependiente de pH. Por cada 5 unidades de los EDLb's se obtuvieron los siguientes resultados.

**Tabla 9. Valores de potencial zeta del EDLb clásico y el EDLb a partir de bazo seco.**

	EDLb clásico	EDLb a partir de bazo seco
<b>pH 4</b>	156.1	125.8
<b>pH 6</b>	66.4	34.2
<b>pH 7</b>	186.9	161.5
<b>pH 10</b>	312.3	305.6

De acuerdo a los resultados de pontencial zeta, se puede observar que el EDLb clásico tiene valores ligeramente mayores que el EDLb a partir de bazo seco, tal como se muestra en la Tabla 9 y se puede observar que a medida que aumentamos el pH, es decir mas la solución más alcalina, los valores de potencial zeta incrementan de igual forma para ambos EDLb's tal como se muestra en la Figura 15.

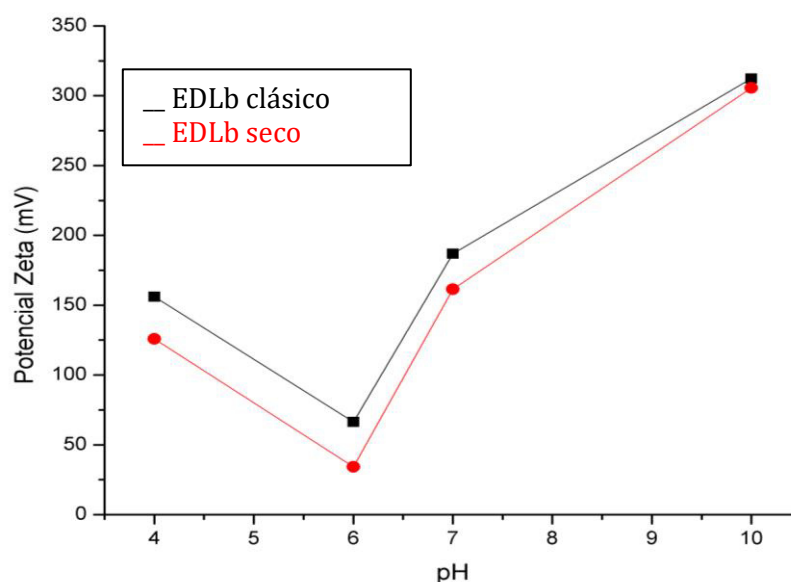


Figura 15. Valores de potencial zeta del EDLb clásico (en negro) y EDLb seco (en rojo) de acuerdo al pH.

#### 1.1.5. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Mediante la microscopía electrónica de barrido se observó la topografía del EDLb a partir de bazo seco y clásico, y para comprobar estos resultados se emplearon espectroscopía de infrarrojo y difracción de rayos X, encontrando que en la topografía del EDLb a partir de bazo seco se aprecia una estructura más densa, en comparación con el EDLb clásico que se aprecia una estructura menos densa y más definida (Figura 16) Otra ventaja que nos proporcionó el microscopio electrónico de barrido fue el análisis puntual químico-elemental, en el cual se vió que en el EDLb clásico y el EDLb seco se encontraron presentes los elementos carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O) , sodio (Na), aluminio (Al) y fósforo (P); sin embargo en el EDLb clásico se encontró además magnesio (Mg), y cloro (Cl) (Figura 17).

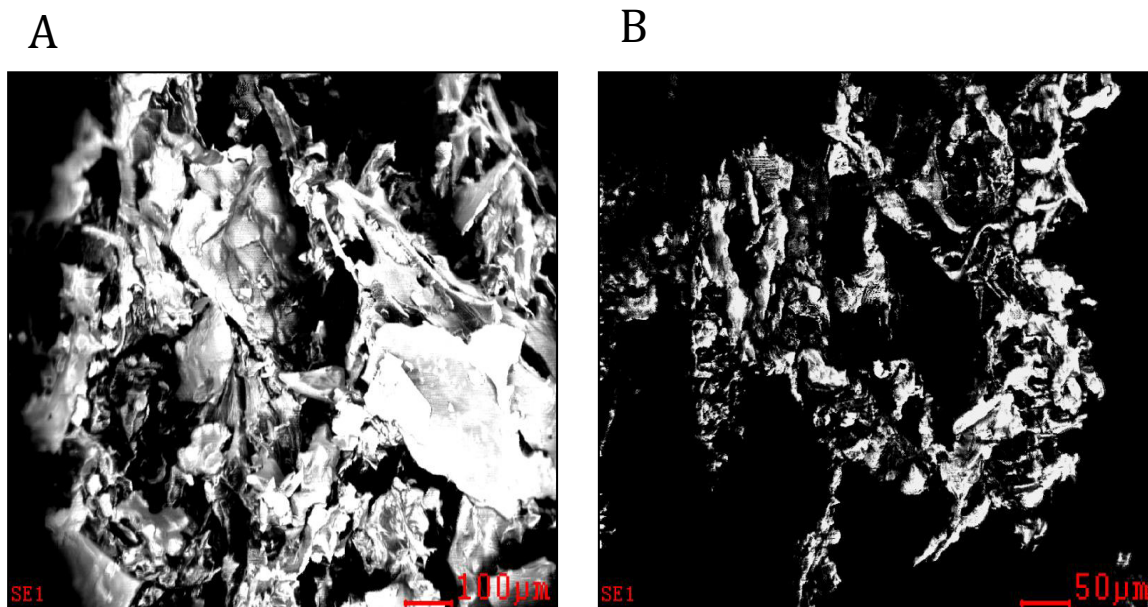


Figura 16. Micrografías tomadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM). A) topografía del EDLb seco, mostrándose una mayor densidad presuntamente debido a un aglomerado de los componentes presentes en el EDLb seco a una escala de 100  $\mu\text{m}$ . B) Topografía del EDLb clásico en el cual se observa menor densidad a 50  $\mu\text{m}$ .

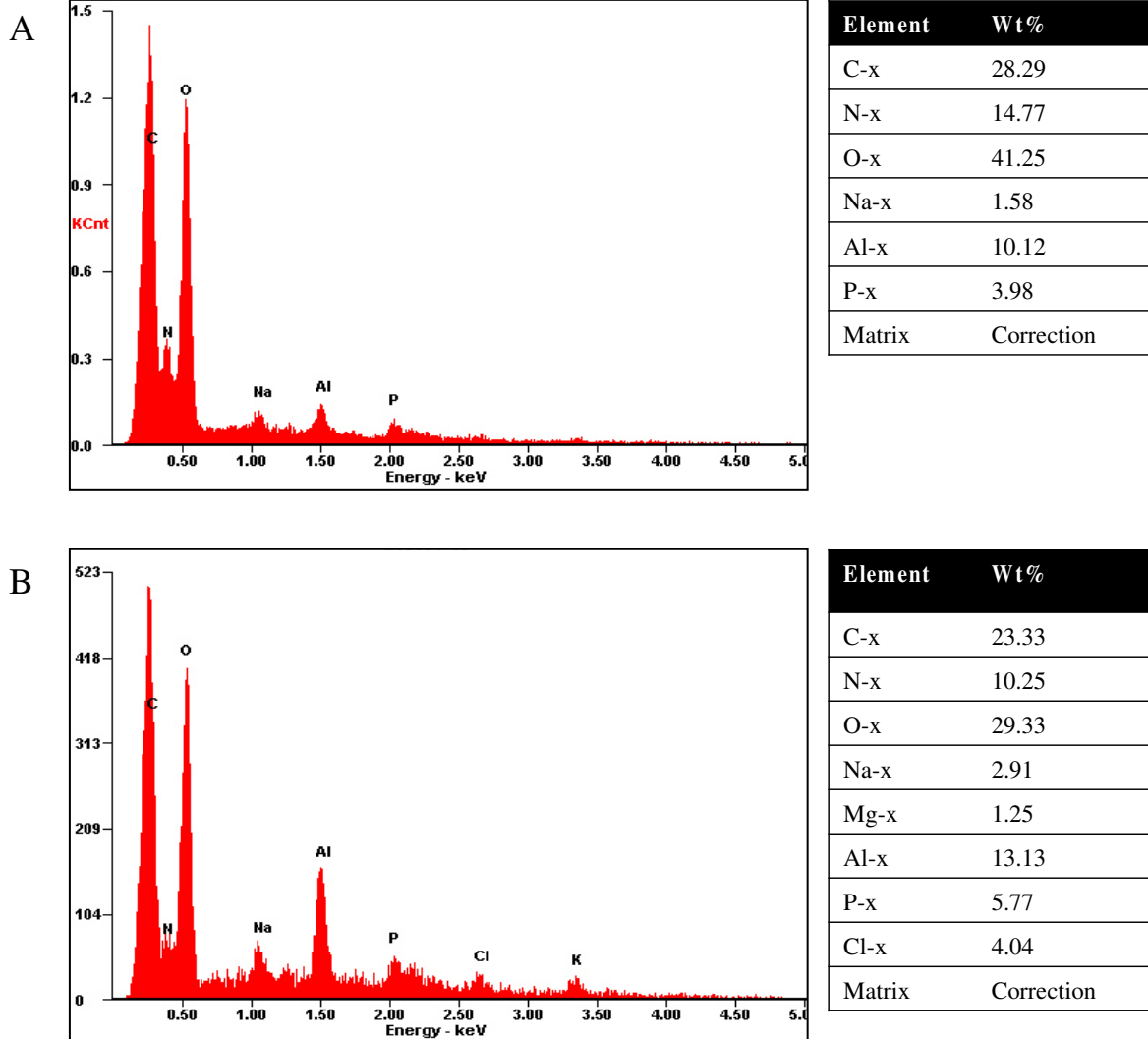


Figura 17. Análisis químico-elemental en microscopio electrónico de barrido. A) Análisis de rayos X de cada elemento presente en el EDLb seco, con sus respectiva tabla conteniendo el porcentaje en peso de cada elemento. B) Analisis de rayos X de cada elemento presente en el EDLb clásico, con sus respectiva tabla conteniendo el porcentaje en peso de cada elemento.

## Actividad antitumoral

### 1.1.6. Cuantificación de proteína por el método de Lowry

La concentración de proteína fue evaluada por el método de Lowry, interpolando las absorbancias obtenidas para cada EDLb en la curva estándar mostrando los siguientes resultados, para EDLb clásico 6.47 mg/mL y EDLb seco 8.49 mg/mL de proteínas.

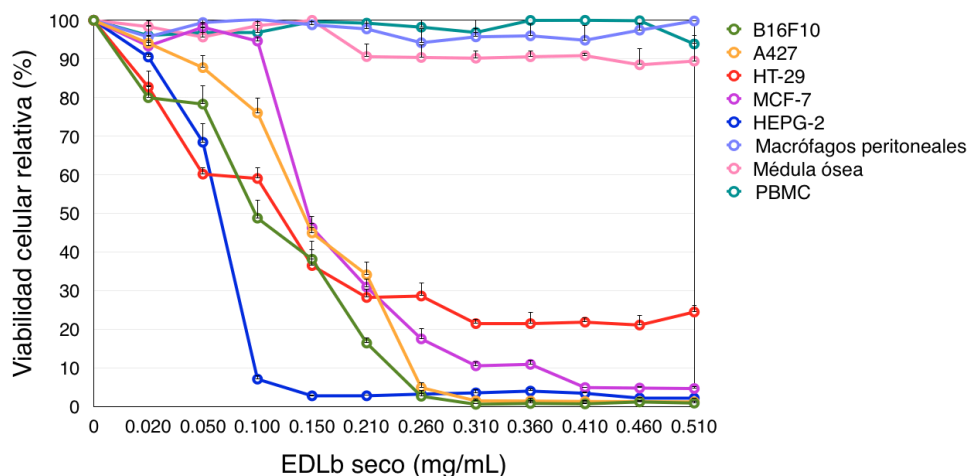


Figura 18. Curva de viabilidad en líneas celulares de cáncer tratadas con EDLb seco. Se trataron  $5 \times 10^3$  células por pozo en placa de 96 pozos de cada línea celular B16F10, A427, HT-29, MCF-7 y HEPG-2 con diferentes dosis del EDLb seco incubadas con medio DMEM + 10% SFB en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas.

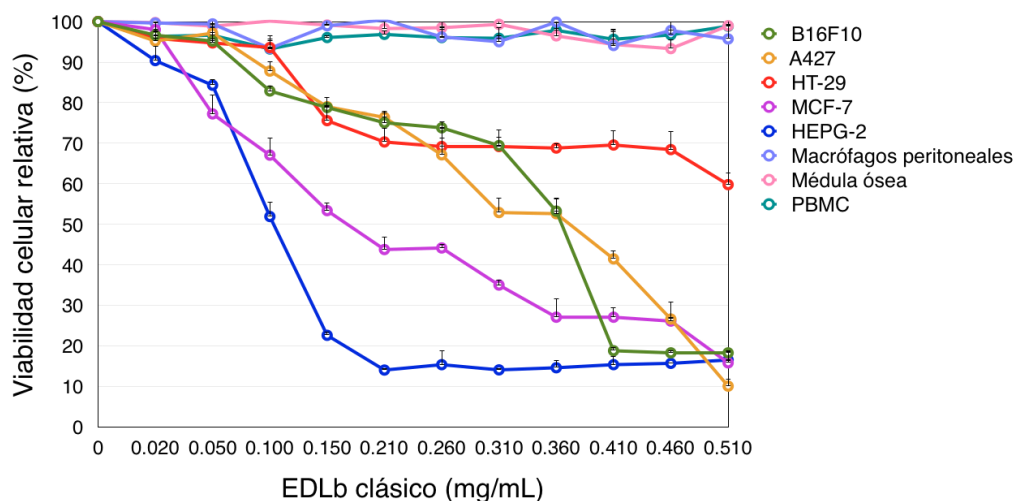


Figura 19. Curva de viabilidad en líneas celulares de cáncer tratadas con EDLb clásico. Se trataron  $5 \times 10^3$  células por pozo en placa de 96 pozos de cada línea celular de cáncer B16F10, A427, HT-29, MCF-7 y



HEPG-2 con diferentes dosis del EDLb clásico incubadas con medio DMEM + 10% SFB en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Los resultados demuestran que el tratamiento con el EDLb seco o el EDLb clásico, tiene la capacidad de afectar la viabilidad de las células B16F10, A427, HT-29 y MCF-7 de una manera dependiente de dosis ( $p < 0.05$ ), siendo menos susceptible a ambos tratamientos la línea celular HT-29. Además observamos que el EDLb seco ejerce su efecto citotóxico a una menor dosis comparado con el EDLb clásico.

La Tabla 11 muestra la dosis letal media que se obtuvo en los tratamientos con EDLb clásico y EDLb seco en las líneas celulares de cáncer.

Tabla 11. Dosis letal media de los tratamientos con EDLb clásico y seco

Línea celular	Dosis letal media de EDLb clásico	Dosis letal media de EDLb seco
<b>B16F10</b>	1.80 mg/mL	0.50 mg/mL
<b>A427</b>	1.55 mg/mL	0.75 mg/mL
<b>HT-29</b>	2.55 mg/mL	0.50 mg/mL
<b>MCF-7</b>	0.75 mg/mL	0.75 mg/mL
<b>HEPG-2</b>	0.50 mg/mL	0.50 mg/mL

En el caso de las células mononucleares de sangre periférica de humano, macrófagos peritoneales de murino y células de médula ósea de murino, se observa que tanto el tratamiento con el EDLb clásico y el EDLb seco no se ve afectada su viabilidad.

## Actividad anti-inflamatoria en macrófagos peritoneales de murino

En cuanto al papel del EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco se observó su capacidad para modular la producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos peritoneales de murino.

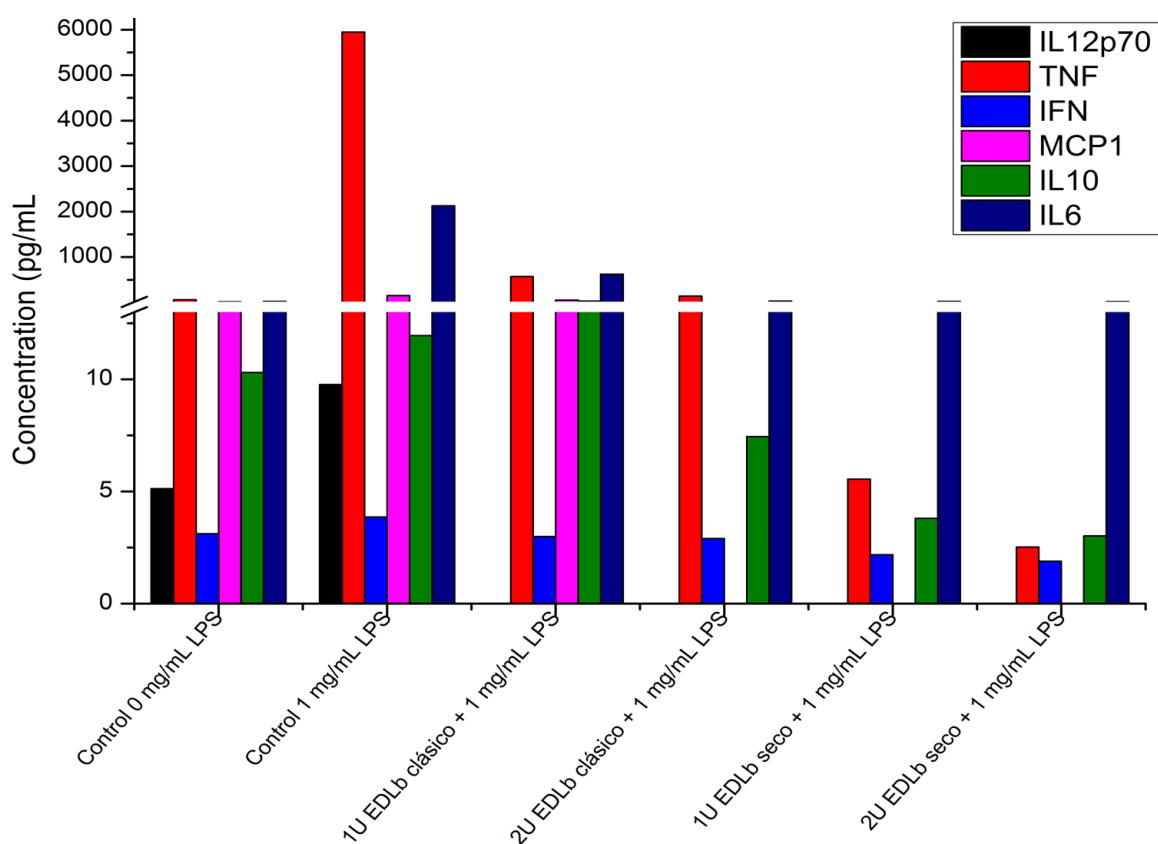


Figura 20. Actividad anti-inflamatoria en macrófagos peritoneales murino estimulados con LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco a las 5 horas. Los macrófagos peritoneales de murino fueron estimulados con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratados con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb a partir de bazo seco. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 5 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó la expresión de citocinas pro-inflamatorias mediante citometría de flujo empleando el kit comercial cytometric bead array mouse inflammation (BD bioscience) analizado en el software FCAP array versión 3.0

Se determinó que los macrófagos peritoneales de murino tienen la capacidad de producir IL12p70, TNF, IFN, MCP1, IL-6 e IL-10 sin ningún estímulo; y en aquellos estimulados con LPS (1 mg/mL) se incrementó la producción de éstas citocinas. Los macrófagos estimulados con LPS (1 mg/mL) y tratados con EDLb clásico (1U/mL) disminuye la

producción de TNF, IFN, IL-6 e IL-10 comparado con los macrófagos estimulados con LPS sin afectar la producción de MCP-1, en cuanto a IL12p70 no hubo detección de ésta. El tratamiento de macrófagos estimulados con LPS y 2 U/mL de EDLb clásico disminuyó la producción de TNF, IFN, IL6 e IL-10. No se detectó IL12p70 y MCP-1. Por otra parte los tratamientos de macrófagos estimulados con LPS con 1 U/mL y 2 U/mL del EDLb seco disminuyeron la producción de TNF, IFN e IL-10. No se detectó IL-12p70 y MCP-1 a las 5 horas (Figura 20).

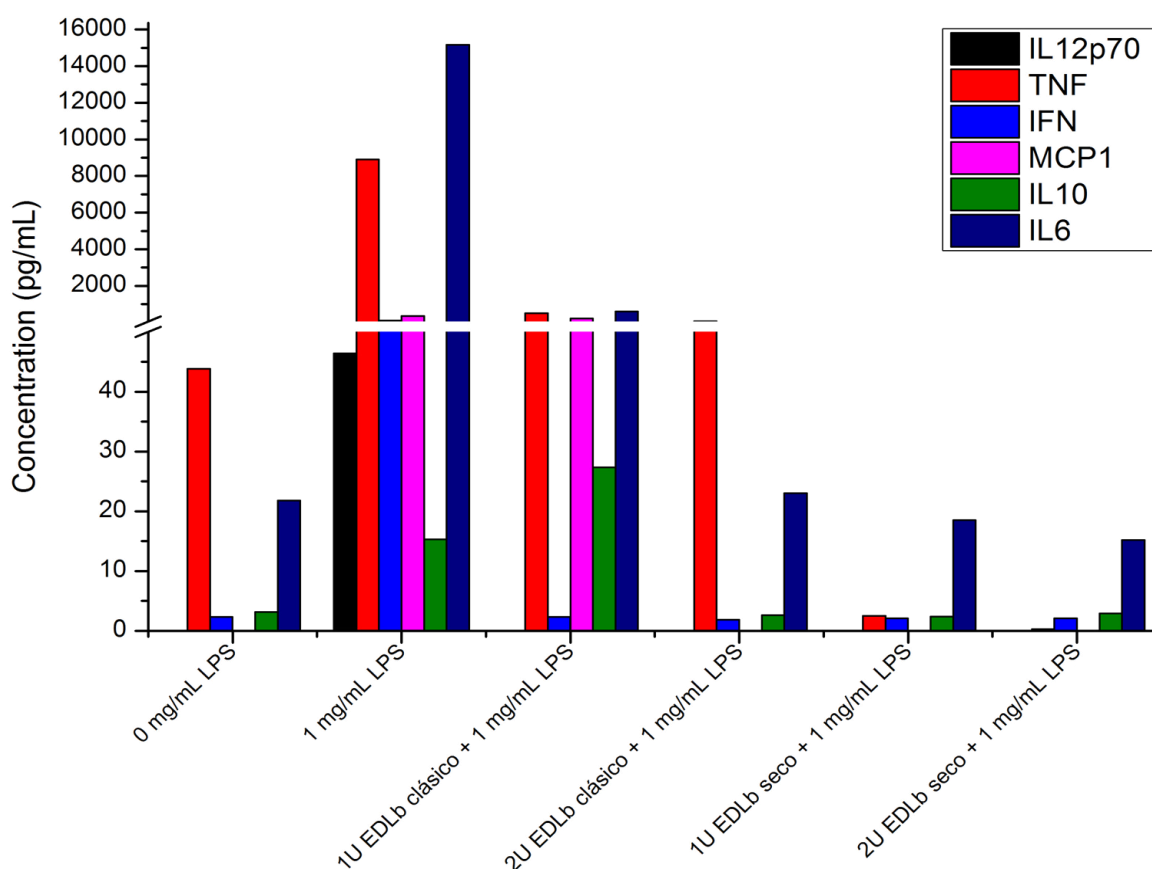


Figura 21. Actividad anti-inflamatoria en macrófagos peritoneales murino estimulados con LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 24 horas. Los macrófagos peritoneales murinos fueron estimulados con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratados con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 24 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó la expresión de citocinas pro-inflamatorias mediante citometría de flujo empleando el kit comercial cytometric bead array mouse inflammation (BD bioscience) analizado en el software FCAP array versión 3.0

En la Figura 21 se muestra que los macrófagos peritoneales de murino tienen la capacidad de producir TNF, IFN, IL-6 e IL-10 sin ningún estímulo; sin embargo no se detectó presencia de IL12p70 y MCP-1 a las 24 horas . Aquellos macrófagos estimulados con LPS (1 mg/mL) se observa un incremento la producción de IL12p70, TNF, IFN, MCP1, IL-6 e IL-10. En los macrófagos estimulados con 1 mg/mL de LPS y tratados con 1 U/mL de EDLb clásico se disminuyó la producción de TNF, IFN, IL-6 e IL-10 comparado con los macrófagos estimulados con LPS, sin afectar la producción de MCP-1, en cuanto a IL12p70 no hubo detección de ésta. El tratamiento de macrófagos estimulados con 1 mg/mL LPS y 2 U/mL de EDLb clásico disminuyó aún más la producción de TNF, IFN, IL6 e IL-10. No se detectó IL12p70 y MCP-1. Por otra parte los tratamientos de macrófagos estimulados con LPS con 1 U/mL y 2 U/mL del EDLb seco disminuyeron la producción de TNF, IFN e IL-10. No se detectó IL-12p70 y MCP-1 a las 24 horas.

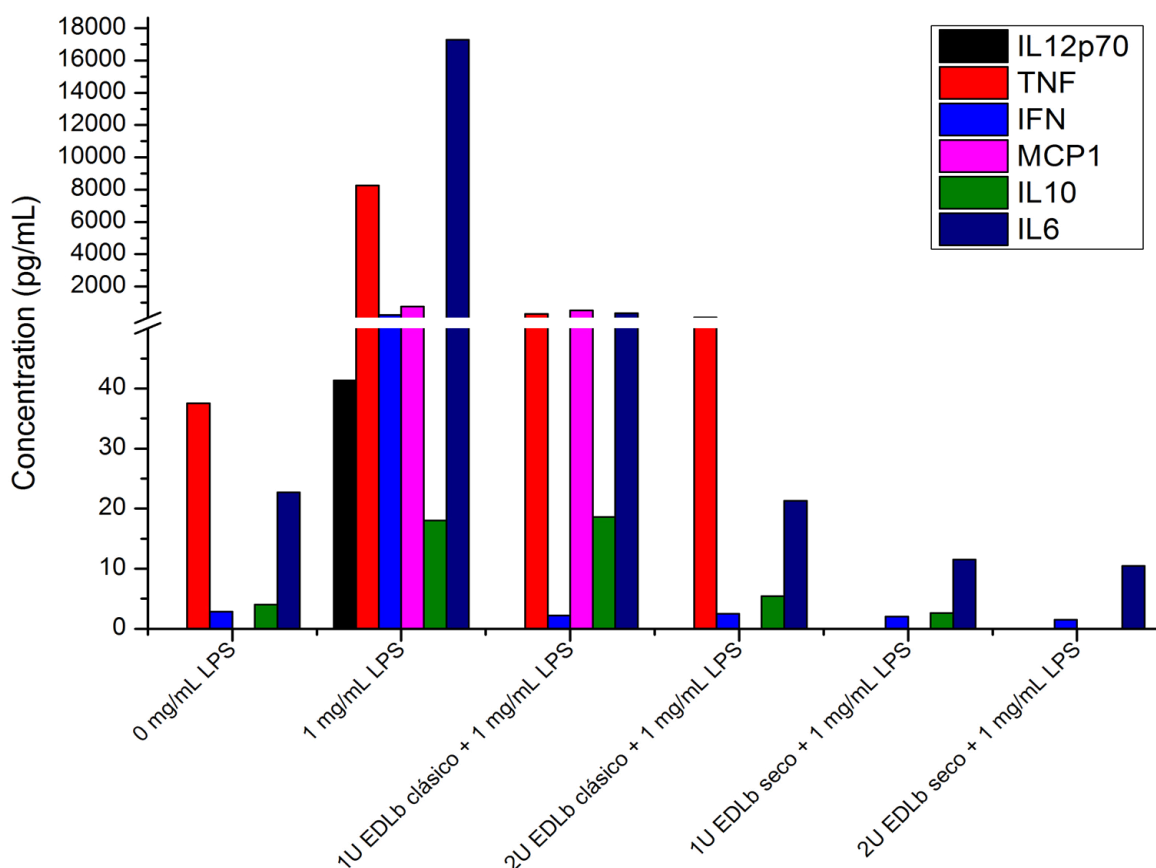


Figura 22. Actividad anti-inflamatoria en macrófagos peritoneales murino estimulados con de LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 48 horas. Los macrófagos peritoneales de murinos fueron estimulados con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratados con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 48 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó la expresión de citocinas pro-inflamatorias mediante citometría de flujo empleando el kit comercial cytometric bead array mouse inflammation (BD bioscience) analizado en el software FCAP array versión 3.0

Por último se analizaron las citocinas pro-inflamatorias en macrófagos peritoneales de murino a las 48 horas, como se observa en la Figura 22 en los macrófagos sin estímulo de LPS se observa que hay producción de TNF, IFN, IL-10 e IL-6, sin estar presentes IL12p70 Y MCP-1. En el caso de aquellos estimulados con LPS se observa que hay un incrementó de IL12p70, TNF, IFN, MCP1, IL-6 e IL-10. Para los macrófagos estimulados con LPS y tratados con 1 U/mL de EDLb clásico se observa que se disminuyó la producción de TNF, IFN e IL-6, no se observó diferencia en la concentración de MCP-1 e IL-10 y no hubo presencia de IL12p70. Para el caso de los macrófagos estimulados con LPS y tratados con 2

U/mL de EDLb clásico hubo producción de TNF, IFN, IL-10 e IL-6; no se detectó IL12p70 y MCP-1. Para los macrófagos estimulados con LPS y tratados con 1 U/mL de EDLb seco hubo bajas concentraciones de IFN, IL-10 e IL-6; no se detectó la presencia de IL12p70, TNF y MCP-1. En los macrófagos estimulados con LPS y tratados con 2 U/mL de EDLb seco únicamente hubo concentraciones bajas de IFN e IL-6; no se detectó IL12p70, TNF, MCP-1 e IL-10.

## Actividad anti-inflamatoria en células mononucleares de sangre periférica de humano

Una vez que se determinó la producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos peritoneales de murino, se procedió a realizar este ensayo en células mononucleares de sangre periférica de humano, para así observar el comportamiento de éstas células al ser estimuladas con LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y el efecto biológico por parte del EDLb clásico y el EDLb a partir de bazo seco.

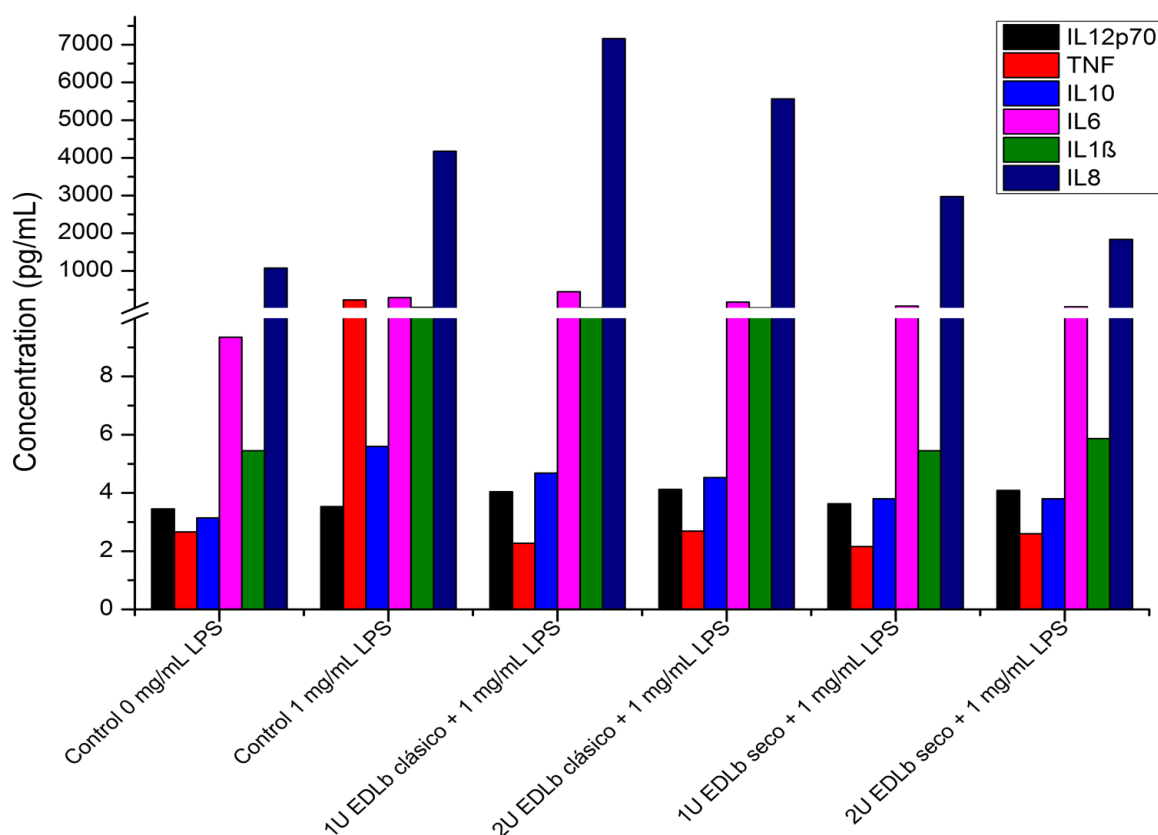


Figura 23. Actividad anti-inflamatoria en células de sangre periférica estimuladas con LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 5 horas. Las células mononucleares de sangre periférica fueron estimuladas con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratadas con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 5 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó la expresión de citocinas pro-inflamatorias mediante citometría de flujo empleando el kit comercial cytometric bead array human inflammatory cytokines (BD bioscience) analizado en el software FCAP array versión 3.0

En la Figura 23 se muestra que las PBMC sin estímulo de LPS son capaces de producir IL12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8, y en aquellas estimuladas con LPS se observa un incremento de las citocinas antes mencionadas. Para las PBMC estimuladas con LPS y tratadas con 1 U/mL y 2 U/mL de EDLb clásico únicamente se disminuyó la concentración de TNF comparadas con aquellas estimuladas con LPS pero no hubo disminución en la concentración de IL12p70, IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$ , sin embargo la concentración de IL-8 se vio aumentada. En el caso de las PBMC estimuladas y tratadas con 1 U/mL y 2 U/mL EDLb seco se observa la producción de IL12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 similar que en las PBMC sin estímulo a las 5 horas.

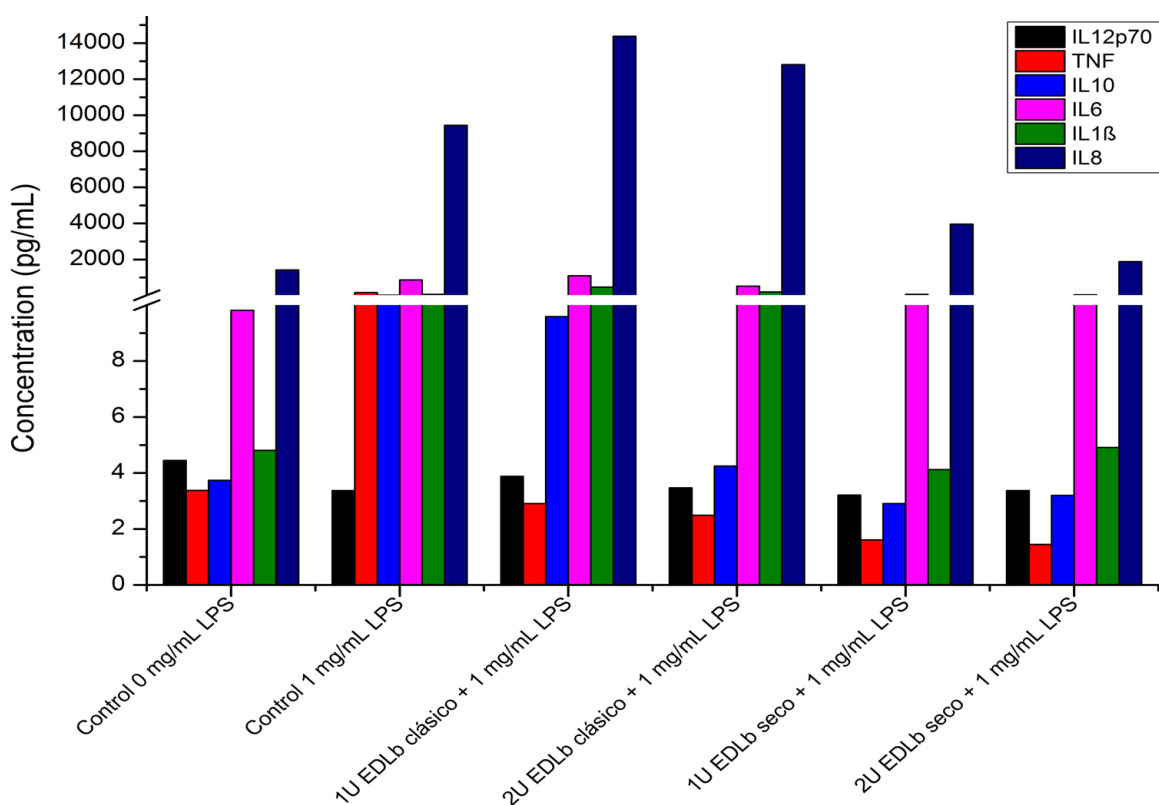


Figura 24. Actividad anti-inflamatoria en células de sangre periférica estimuladas con LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 12 horas. Las células mononucleares de sangre periférica fueron estimuladas con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratadas con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 12 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmosfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó la expresión de citocinas pro-inflamatorias mediante citometría de flujo empleando el kit comercial cytometric bead array human inflammatory cytokines (BD bioscience) analizado en el software FCAP array versión 3.0



En la Figura 24 Se muestra que las PBMC sin estímulo de LPS son capaces de producir IL12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8, y en aquellas estimuladas con LPS se observa un incremento de las citocinas antes mencionadas. Para las PBMC estimuladas con LPS y tratadas con 1 U/mL y 2 U/mL de EDLb clásico únicamente se disminuyó la concentración de TNF comparadas con aquellas estimuladas con LPS pero no hubo disminución en la concentración de IL12p70, IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$ , sin embargo la concentración de IL-8 se vio aumentada. En el caso de las PBMC estimuladas y tratadas con 1 U/mL y 2 U/mL EDLb seco se observa la producción de IL12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 similar que en las PBMC sin estímulo a las 5 horas.

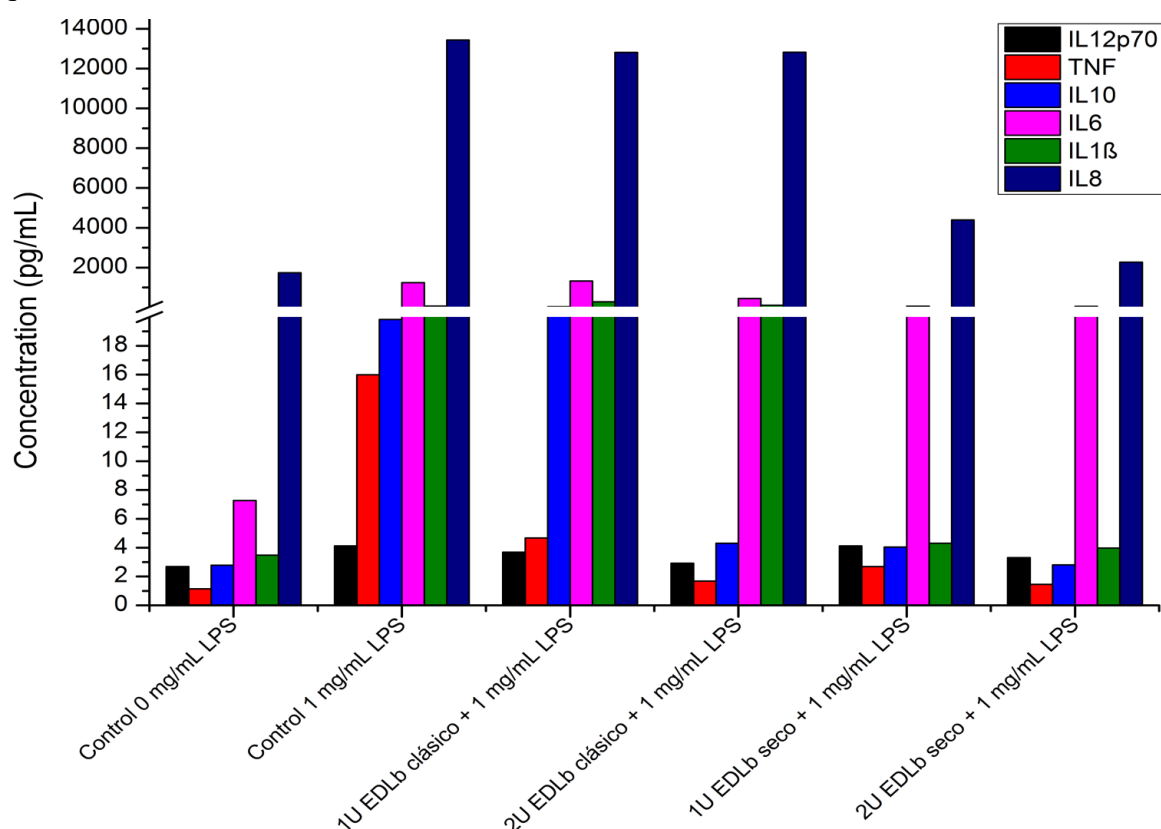


Figura 25. Actividad anti-inflamatoria en células de sangre periférica estimuladas con LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco a las 24 horas. Las células mononucleares de sangre periférica fueron estimuladas con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratadas con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 24 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó la expresión de citocinas pro-inflamatorias mediante citometría de flujo empleando el kit comercial cytometric bead array human inflammatory cytokines (BD bioscience) analizado en el software FCAP array versión 3.0

En la Figura 25 se muestra que en las PBMC sin estímulo de LPS a las 24 horas se mantuvieron las mismas concentraciones de las citocinas IL12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 que a las 12 horas (ver Figura 24). En las PBMC estimuladas con LPS se observó un incremento en la concentración de IL-8, para el resto de las citocinas IL12p70, TNF, IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$  no disminuyeron ni aumentaron las concentraciones con el LPS como aquellas estimuladas con LPS a las 12 horas (ver Figura 24). En cuanto a las PBMC estimuladas con LPS y tratadas con 1 U/mL y 2 U/mL de EDLb clásico se observan las mismas concentraciones de citocinas antes mencionadas en comparación al tratamiento a las 12 horas (ver figura 12 hrs), lo mismo ocurrió en las PBMC estimuladas con LPS y tratadas con EDLb seco, las concentraciones de citocinas IL12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 resultaron ser similares a las 12 horas de tratamiento (ver Figura 24).

## Evaluación de la expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en macrófagos peritoneales de murino.

Otra actividad biológica que presenta el EDLb es como agente antioxidante, es por ello que se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno en macrófagos peritoneales de murino estimulados con LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb seco

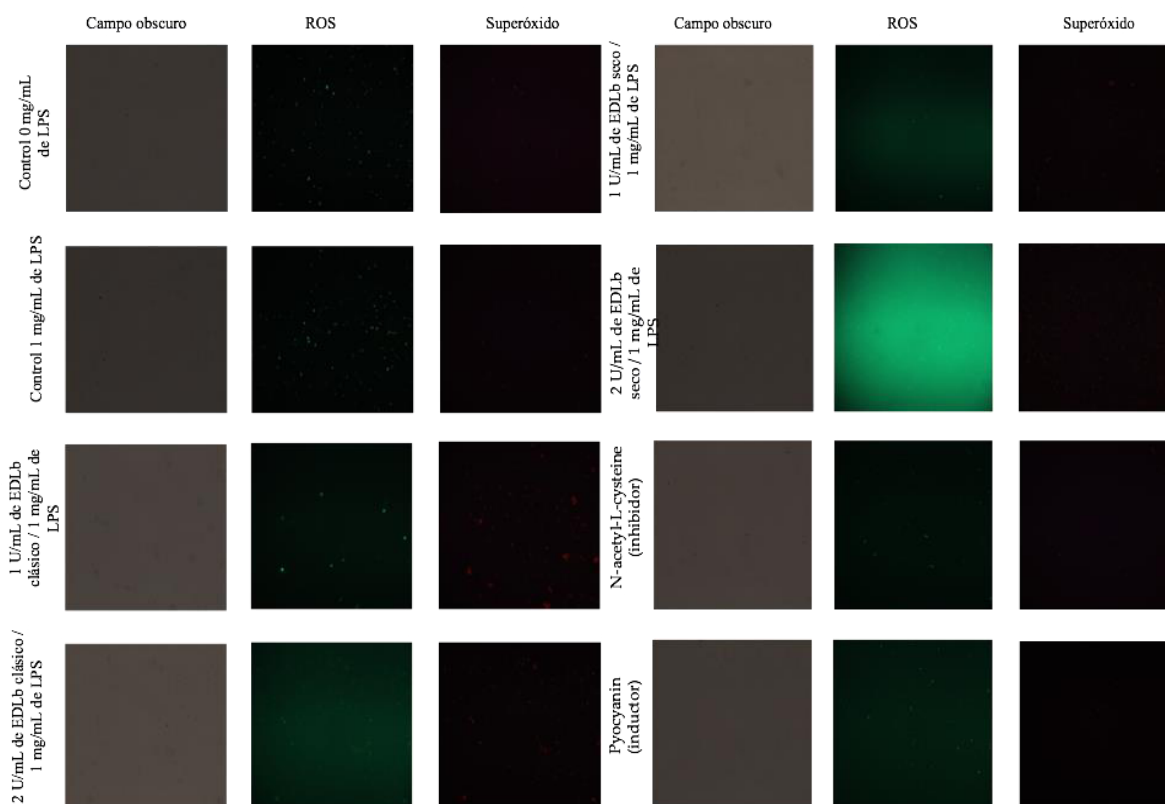


Figura 26. Expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en macrófagos peritoneales de murino por microscopía de fluorescencia. Los macrófagos peritoneales de murino fueron estimuladas con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratadas con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco, para el control positivo se empleó piocianina y N-acetil-L-cisteína como control negativo. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 24 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó la expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido empleando el kit comercial ROS-ID™ Total ROS/Superoxide 51010, Enzo Life Sciences, mediante microscopía de fluorescencia.

Se evaluó la producción de superóxido y ROS a las 24 horas, encontrando generación de ROS en macrófagos sin ningún tipo de estímulo, sin embargo hubo muy poca intensidad de fluorescencia para superóxido. En el caso de los macrófagos estimulados con LPS se observa mayor número de células que emiten fluorescencia para ROS, siendo lo contrario para superóxido. En cuanto a los tratamientos de macrófagos estimulados con LPS y tratados con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico se observa que disminuye el número de células que emiten fluorescencia para ROS y aumenta el número de células que emiten fluorescencia para superóxido, para los macrófagos estimulados con LPS y tratados con 1 y 2 U/mL de EDLb seco se observa que hay una menor cantidad de células que emiten fluorescencia para ROS y aumenta el número de células que emiten fluorescencia para superóxido en comparación con los tratamientos con EDLb clásico.

## Evaluación de la expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en células mononucleares de sangre periférica de humano.

Una vez que evaluamos la expresión de ROS y superóxido en macrófagos de murino se realizó este mismo ensayo en PBMC de humano estimuladas con LPS y tratados con EDLb clásico y EDLb seco.

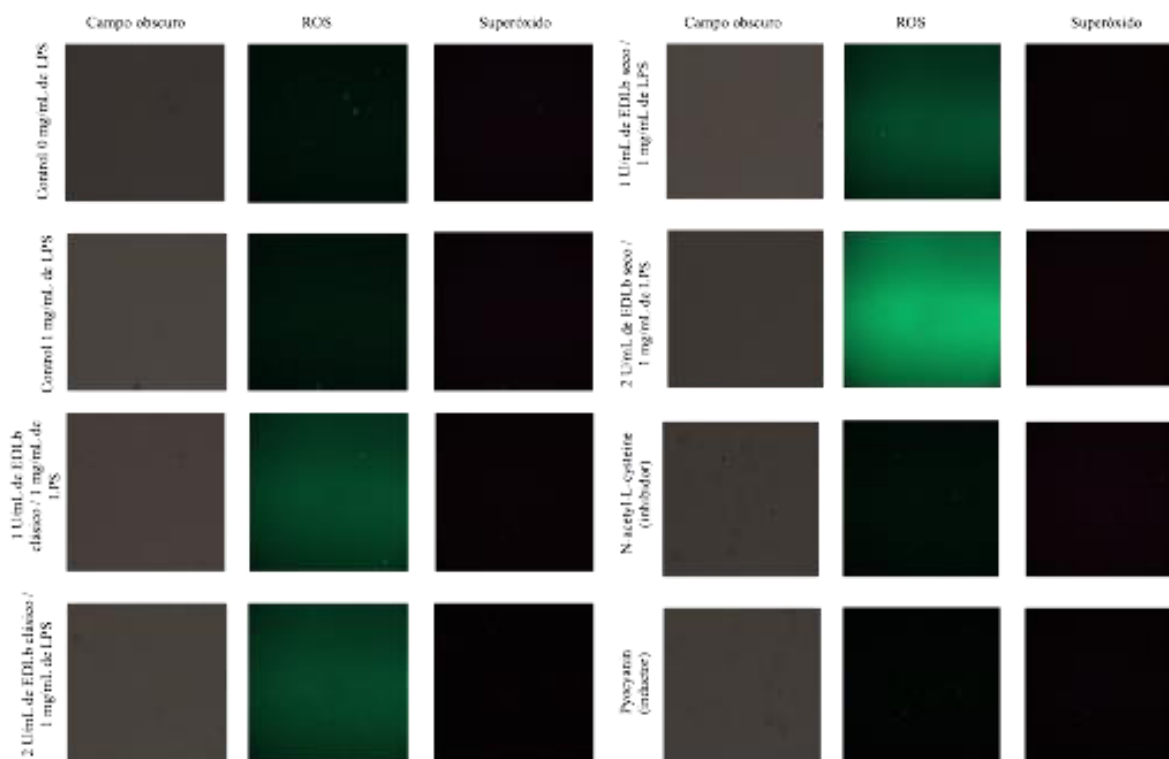


Figura 27. Expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido en células mononucleares de sangre periférica de humano por microscopía de fluorescencia. Las células mononucleares de sangre periférica fueron estimuladas con 1 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* O127:B8) y tratadas con 1 y 2 U/mL de EDLb clásico y EDLb partir de bazo seco, para el control positivo se empleó piocianina y N-acetil-L-cisteína como control negativo. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 24 horas con medio RPMI + 10% SFB en una atmósfera conteniendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente se determinó la expresión de especies reactivas de oxígeno y superóxido empleando el kit comercial ROS-ID™ Total ROS/Superoxide 51010, Enzo Life Sciences, mediante microscopía de fluorescencia.

## DISCUSIÓN

La espectroscopía de infrarrojo es uno de los métodos clásicos para determinación estructural de moléculas pequeñas. La existencia es debido a su sensibilidad para la composición química y morfología de moléculas. Debido a la información que nos proporciona la espectroscopía de infrarrojo en los sistemas biológicos hace de éste una herramienta valiosa para la investigación de la estructura de proteínas (Arrondo et al. 1993). Es un técnica empleada para dilucidar estructura secundaria en muestras de naturaleza proteica (Pelton and McLean 2000) ya que exhibe bandas características de amidas las cuales representan diferentes vibraciones en proteínas (Surewicz, Mantsch, and Chapman 1993).

Para el EDLb clásico se observaron modos de vibración relacionados con los grupos radicales  $\text{-C-N}$  a  $1330\text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{-C-H}$  a  $1350$ ,  $1400$  y  $1470\text{ cm}^{-1}$  y  $\text{-NH}_3^+$  a  $1517\text{ cm}^{-1}$ . Las longitudes de onda mismas que no se observaron en EDLb seco (ver figura 12 y 13), demostrando que las estructuras de los EDLb presentan diferencias claras en los niveles de interacción de los grupos antes mencionados, este resultado se puede relacionar con el porcentaje de humedad ya que el ancho de banda observado a los  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los enlaces O-H, fue mayor para el EDLb clásico.

Al presentar mayor cantidad de grupos radicales la estructura del EDLb clásico presentará una tendencia a generar enlaces de hidrógeno con su entorno (Asakura et al. 2014) lo cual produce en la estructura una modificación de la cristalinidad como se observó en la difracción de rayos X (Figura 14). La difracción de rayos X es una técnica altamente empleada para determinar cristalinidad en las muestras (Jenkins et al. 2013), a pesar de que no se utilizó difracción de rayos X para proteínas, sino la técnica habitual para materiales inorgánicos, se observó una diferencia notable del patrón de difracción de cada EDLb siendo el seco más cristalino.

Las posiciones de los hidrógenos son importantes para la determinación estructural de las moléculas presentes en ambos extractos, ya que esas estructuras son determinadas por los puentes de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, debido a la complejidad de

determinar la posición de estos enlaces, el espectro de infrarrojo nos aportó información suficiente para dilucidar estructura secundaria de las moléculas presentes en los extractos; presentando el EDLb clásico posiblemente una estructura  $\alpha$ -hélice por la presencia de un mayor número de enlaces C-H en comparación con el EDLb seco que no se aprecian éstas bandas en el espectro de infrarrojo por lo que se presume que presenta una estructura  $\beta$ -plegada, el análisis de difracción de rayos X se complementa con el análisis de infrarrojo ya que la cristalinidad se mide en el área bajo la curva que presentan los patrones de difracción, de acuerdo a esto la cristalinidad es directamente proporcional a la intensidad y ancho del patrón de difracción siendo el EDLb seco más cristalino y esto se correlaciona con el tipo de estructura secundaria que presenta (ver figura 12 y 14) (Asakura et al. 2014).

De acuerdo a la tabla las bandas de absorción que aparecen en el espectro de infrarrojo del EDLb clásico pero no aparecen en el EDLb seco, en su mayoría se relacionan con enlaces tipo C-H, lo que sugiere que la estructura molecular del EDLb clásico se encuentra organizada con ramificaciones que le confieren una mayor probabilidad de formar enlaces de hidrógeno con el medio y por tanto mayor solubilidad. La interacción de moléculas de agua con una estructura peptídica, genera un desplazamiento intramolecular produciendo un cambio en los patrones de difracción del EDLb, este fenómeno se ha relacionado con el cambio de estructura de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada, para proteínas o péptidos con menor cristalinidad como se observa en el difractograma de rayos X el EDLb clásico tiene una cristalinidad menor que el EDLb seco (figura 14), por lo tanto los resultados de FT-IR, XRD y Potencial Z se correlacionan entre sí, comprobando que la principal diferencia entre el EDLb clásico y el EDLb seco, es de tipo estructural, no hay grupos hidroxilo disponibles para la formación de puentes de hidrógeno (Asakura et al. 2014) (Bradley et al. 2011) y esto mismo lo podemos corroborar en los análisis de potencial zeta en el cuál mide la magnitud de interacciones electrostáticas entre las cargas superficiales, esto nos indica el grado de dispersión y estabilidad de las biomoléculas. El potencial zeta representa diferentes valores de carga superficial en presencia de solución acuosa cuando los grupos funcionales se disocian en la superficie o los iones son adsorbidos en la superficie. Variando el pH en la fase acuosa, ocurrirán dos mecanismo, la disociación de grupos funcionales y adsorción de iones, los valores de potencial zeta en el EDLb clásico fueron

ligeramente mayores que en el EDLb seco, en ambos extractos los valores fueron positivos a pH 4, 6, 7 y 10; lo cuál nos indica que ambos extractos presentan alta estabilidad en la solución y las partículas se encuentran dispersadas debido a que existe repulsión entre las moléculas cargadas y los iones que se encuentran en la solución (figura 15) (Salgin, Salgin, and Bahadır 2013).

El Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy), utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos (Wu, Deng, and Klinke II 2015). Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra (Micic et al. 1999) (Picard, White, and Turnbull 2013). En la figura 16.A se muestra la topografía del EDLb seco observándose una estructura más compacta y en la figura 16.B el EDLb clásico con una estructura más abierta, en cuanto al análisis químico elemental que nos proporcionó el microscopio electrónico de barrido, con los resultados obtenidos de caracterización de la muestra por espectroscopía de infrarrojo, potencial zeta, dirección de rayos X y microscopía electrónica de barrido se logró observar diferencia de tipo estructural entre el EDLb clásico y el EDLb seco.

Tanto el EDLb clásico y el EDLb seco modulan la producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos peritoneales de murino estimulados con LPS, ya que la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y NO es menor con el tratamiento de éstos extractos, Franco Molina y colaboradores observaron los mismos resultados, sin embargo con aquellas células tratadas con el EDLb seco se vio un mayor decremento de las citocinas anteriormente mencionadas (Moisés A. Franco-Molina et al. 2005). Este mismo efecto inmunomodulador se vio en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS y tratadas con EDLb clásico y EDLb seco en el cual las citocinas TNF, IL-6, e IL-8 decrecieron de manera significativa (Ojeda et al. 2005). La importancia en la disminución de la expresión de estas citocinas radica en la modulación de la vía de señalización NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B, siendo esta involucrada en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y NO, Franco Molina y colaboradores propusieron un modelo hipotético del mecanismo de acción del EDLb, en el cual tiene la capacidad de bloquear esa vía, por lo que la producción



de citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno se ve disminuida (Moisés A. Franco-Molina 2011).

En cuanto a la actividad citotóxica se vio que el EDLb seco ejerce un mayor efecto en todas las líneas celulares de cáncer, por lo contrario en los macrófagos peritoneales de murino, células de médula ósea de murino y células mononucleares de sangre periférica (M.A. Franco-Molina et al. 2006) lo cual es un efecto deseado ya que anteriormente se ha visto que el EDLb puede ser empleado como adyuvante en quimioterapia de pacientes con cáncer ya que posee un efecto protector en los linajes hematopoyéticos y con esto aumenta la calidad de vida de los pacientes (Pizza et al. 1996) (Lara 2010) (Coronado-Cerda, Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, et al. 2016).

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de caracterización podemos concluir que existen diferencias químicas y estructurales entre el EDLb clásico y el EDLb seco, las cuales podrían marcar diferencias en su actividad biológica como son una estructura  $\beta$ -plegada, mayor cristalinidad para el EDLb seco el cual demostro una mayor actividad antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante que el EDLb clásico.

1. Se determinó que el EDLb clásico presenta una estructura  $\alpha$ -hélice y que el EDLb seco presenta una estructura secundaria correspondiente a una  $\beta$ -plegada.
2. Se determinó que el EDLb seco es más cristalino que el EDLb clásico.
3. Se determinó que el EDLb clásico presentó mayores valores de potencial zeta que el EDLb seco, sin embargo estos valores obtenidos no son críticos para ambos productos permitiendo la repulsión entre las partículas adyacentes, logrando una suspensión satisfactoria.
4. Se determinó mediante microscopía electrónica de barrido que el EDLb seco se observa morfológicamente mas compacto que el EDLb clásico, y en cuanto al análisis químico-elemental se encontraron en ambos EDLb la presencia de carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O) , sodio (Na), aluminio (Al) y fósforo (P); sin embargo en el EDLb clásico se encontró además magnesio (Mg) y cloro (Cl).
5. Se determinó que el EDLb seco presenta mayor actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer A427, B16F10, HEPG2, HT-29 y MCF-7 en comparación con el EDLb clásico.
6. Se determinó que el tratamiento con el EDLb seco tiene mayor efecto en la modulación de citocinas pro inflamatorias, mayor efecto en disminuir la expresión de especies reactivas de oxígeno y aumentar la expresión de superóxido en macrófagos peritoneales de murino estimulados con LPS y PBMC estimuladas con LPS que el EDLb clásico.

## PERSPECTIVAS

El presente estudio ha demostrado que la obtención del EDLb seco es un proceso novedoso de obtención el cual facilita y disminuye los costos de producción y almacenaje, además de poder contar con una materia prima en base seca la cual puede ser pesada estandarizando mejor los lotes de producción del extracto dializable de leucocitos de bazo de bovino conteniendo factor de transferencia, sin embargo estudios similares a los realizados con el EDLb clásico *in vitro e in vivo* deben de ser realizados para confirmar su actividad.

## BIBIOGRAFÍA

- Ahluwalia, Jatinder P. 2012. "Immunotherapy in Inflammatory Bowel Disease." *Medical Clinics of North America* 96 (3): 525–44. doi:10.1016/j.mcna.2012.04.009.
- Arnaudov, Atanas, and Zhivka Kostova. 2015. "Dialysable Leukocyte Extracts in Immunotherapy." *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29 (6): 1017–23. doi:10.1080/13102818.2015.1060136.
- Arrondo, J. L., A. Muga, J. Castresana, and F. M. Goñi. 1993. "Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 59 (1): 23–56.
- Asakura, Tetsuo, Koji Yazawa, Kumiko Horiguchi, Furitsu Suzuki, Yusuke Nishiyama, Katsuyuki Nishimura, and Hironori Kaji. 2014. "Difference in the Structures of Alanine Tri- and Tetra-Peptides with Antiparallel  $\beta$ -Sheet Assessed by X-Ray Diffraction, Solid-State NMR and Chemical Shift Calculations by GIPAW: Alanine Oligomers." *Biopolymers* 101 (1): 13–20. doi:10.1002/bip.22241.
- Ascher, Michael S., Abraham Arthur Gottlieb, and Charles H. Kirkpatrick, eds. 1976. *Transfer Factor: Basic Properties and Clinical Applications: Proceedings of the Second International Workshop on Basic Properties and Clinical Applications of Transfer Factor, Held at the United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, October 5-8, 1975*. New York: Academic Press.
- Benz, C. C., G. K. Scott, J. C. Sarup, R. M. Johnson, D. Tripathy, E. Coronado, H. M. Shepard, and C. K. Osborne. 1992. "Estrogen-Dependent, Tamoxifen-Resistant Tumorigenic Growth of MCF-7 Cells Transfected with HER2/neu." *Breast Cancer Research and Treatment* 24 (2): 85–95.
- Borghaei, Hossein, Mitchell R. Smith, and Kerry S. Campbell. 2009. "Immunotherapy of Cancer." *European Journal of Pharmacology*, New Vistas in Anti-Cancer Therapy, 625 (1–3): 41–54. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.067.
- Borish, Larry C., and John W. Steinke. 2003. "2. Cytokines and Chemokines." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111 (2): S460–75. doi:10.1067/mai.2003.108.
- Bowden, R. A., M. S. Siegel, R. W. Steele, L. M. Day, and J. D. Meyers. 1985. "Immunologic and Clinical Responses to Varicella-Zoster Virus-Specific Transfer Factor Following Marrow Transplantation." *The Journal of Infectious Diseases* 152 (6): 1324–27.
- Bradley, Jonathan P., Sitaram P. Velaga, Oleg N. Antzutkin, and Steven P. Brown. 2011. "Probing Intermolecular Crystal Packing in  $\gamma$ -Indomethacin by High-Resolution  $^1\text{H}$  Solid-State NMR Spectroscopy." *Crystal Growth & Design* 11 (8): 3463–71. doi:10.1021/cg200277a.
- Carey, J. T., M. M. Lederman, Z. Toossi, K. Edmonds, S. Hodder, L. H. Calabrese, M. R. Proffitt, C. E. Johnson, and J. J. Ellner. 1987. "Augmentation of Skin Test Reactivity and Lymphocyte Blastogenesis in Patients with AIDS Treated with Transfer Factor." *JAMA* 257 (5): 651–55.
- Chan, D. C., M. Geraci, and P. A. Bunn. 1998. "Anti-Growth Factor Therapy for Lung Cancer." *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 1 (6): 377–88.
- Chang, Yong S., Jalila Adnane, Pamela A. Trail, Joan Levy, Arris Henderson, Dahai Xue, Elizabeth Bortolon, et al. 2007. "Sorafenib (BAY 43-9006)

Inhibits Tumor Growth and Vascularization and Induces Tumor Apoptosis and Hypoxia in RCC Xenograft Models.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 59 (5): 561–74. doi:10.1007/s00280-006-0393-4.

- Chen, F., V. Castranova, X. Shi, and L. M. Demers. 1999. “New Insights into the Role of Nuclear Factor-kappaB, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases.” *Clinical Chemistry* 45 (1): 7–17.
- Chittezhath, Manesh, Gagan Deep, Rana P. Singh, Chapla Agarwal, and Rajesh Agarwal. 2008. “Silibinin Inhibits Cytokine-Induced Signaling Cascades and down-Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Lung Carcinoma A549 Cells.” *American Association for Cancer Research* 7 (7): 1817–26. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0256.
- Ciarimboli, Giuliano. 2014. “Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Side-Effects.” *Anticancer Research* 34 (1): 547–50.
- Coronado-Cerda, Erika Evangelina, Moisés Armides Franco-Molina, Edgar Mendoza-Gamboa, Heriberto Prado-García, Lydia Guadalupe Rivera-Morales, Pablo Zapata-Benavides, María del Carmen Rodríguez-Salazar, Diana Caballero-Hernandez, Reyes Silvestre Tamez-Guerra, and Cristina Rodríguez-Padilla. 2016. “In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil.” *Journal of Immunology Research* 2016: 1–10. doi:10.1155/2016/6942321.
- Coronado-Cerda, Erika Evangelina, Moisés Armides Franco-Molina, S Armides, Edgar Mendoza-Gamboa, Prado-García, Heriberto A, Lydia Guadalupe Rivera-Morales, et al. 2016. “In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil.” *Journal of Immunology Research* 2016 (April): e6942321. doi:10.1155/2016/6942321.
- Dorssers, Dr Lambert C. J., Silvia van der Flier, Arend Brinkman, Ton van Agthoven, Jos Veldscholte, Els M. J. J. Berns, Jan G. M. Klijn, Louk V. A. M. Beex, and John A. Foekens. 2012. “Tamoxifen Resistance in Breast Cancer.” *Drugs* 61 (12): 1721–33. doi:10.2165/00003495-200161120-00004.
- Durant, John R. 1987. “Immunotherapy of Cancer.” *New England Journal of Medicine* 316 (15): 939–41. doi:10.1056/NEJM198704093161509.
- Elliott, Michael, Jacqueline Benson, Marion Blank, Carrie Brodmerkel, Daniel Baker, Kristin Ruley Sharples, and Philippe Szapary. 2009. “Ustekinumab: Lessons Learned from Targeting Interleukin-12/23p40 in Immune-Mediated Diseases.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1182 (December): 97–110. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05070.x.
- Emery, Paul. 2006. “Treatment of Rheumatoid Arthritis.” *BMJ: British Medical Journal* 332 (7534): 152–55.
- Emery, P., and T. Dörner. 2011. “Optimising Treatment in Rheumatoid Arthritis: A Review of Potential Biological Markers of Response.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 70 (12): 2063–70. doi:10.1136/ard.2010.148015.
- Estrada-Parra, S., A. Nagaya, E. Serrano, O. Rodriguez, V. Santamaria, R. Ondarza, R. Chavez, et al. 1998. “Comparative Study of Transfer Factor and Acyclovir in the Treatment of Herpes Zoster.” *International Journal of Immunopharmacology* 20 (10): 521–35.
- Feghali, C. A., and T. M. Wright. 1997. “Cytokines in Acute and Chronic Inflammation.” *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2 (January): d12–26.

- Fidler, I. J. 1973. "Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis." *Nature* 242 (118): 148–49. doi:10.1038/10.1038/newbio242148a0.
- ———. 1975. "Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo." *Cancer Research* 35 (1): 218–24.
- Florea, Ana-Maria, and Dietrich Büsselberg. 2011. "Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects." *Cancers* 3 (1): 1351–71. doi:10.3390/cancers3011351.
- Fogh, Jørgen, Jens M. Fogh, and Thomas Orfeo. 1977. "One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1): 221–26. doi:10.1093/jnci/59.1.221.
- Franco-Molina, M.A., E. Mendoza-Gamboa, D. Miranda-Hernández, P. Zapata-Benavides, L. Castillo-León, C. Isaza-Brando, R.S. Tamez-Guerra, and C. Rodríguez-Padilla. 2006. "In Vitro Effects of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract (bDLE) in Cancer Cells." *Cytotherapy* 8 (4): 408–14. doi:10.1080/14653240600847266.
- Franco-Molina, M. A., E. Mendoza-Gamboa, P. Zapata-Benavides, M. E. Vera-García, P. Castillo-Tello, A. García de la Fuente, R. D. Mendoza, R. G. Garza, R. S. Támez-Guerra, and C. Rodríguez-Padilla. 2008. "IMMUNEPOTENT CRP (bovine Dialyzable Leukocyte Extract) Adjuvant Immunotherapy: A Phase I Study in Non-Small Cell Lung Cancer Patients." *Cytotherapy* 10 (5): 490–96. doi:10.1080/14653240802165681.
- Franco-Molina, Moisés A., Edgar Mendoza-Gamboa, Leonardo Castillo-León, Reyes S. Tamez-Guerra, and Cristina Rodríguez-Padilla. 2005. "Bovine Dialyzable Leukocyte Extract Modulates the Nitric Oxide and Pro-Inflammatory Cytokine Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Peritoneal Macrophages *In Vitro*." *Journal of Medicinal Food* 8 (1): 20–26. doi:10.1089/jmf.2005.8.20.
- Franco-Molina, Moisés Armides, Edgar Mendoza-Gamboa, Paloma Castillo-Tello, Reyes S. Tamez-Guerra, Licet Villarreal-Treviño, Rolando Tijerina-Menchaca, Leonardo Castillo-León, Pablo Zapata-Benavides, and Cristina Rodríguez-Padilla. 2006. "In Vitro Antibacterial Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 28 (3): 471–83. doi:10.1080/08923970600928072.
- Fudenberg, H. H. 1976. "Dialyzable Transfer Factor in the Treatment of Human Osteosarcoma: An Analytic Review." *Annals of the New York Academy of Sciences* 277 (00): 545–57.
- Furuse, Junji. 2008. "Sorafenib for the Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma." *Biologics: Targets & Therapy* 2 (4): 779–88.
- Garcia, Ruben, Richard A. Franklin, and James A. McCubrey. 2006. "Cell Death of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Induced by EGFR Activation in the Absence of Other Growth Factors." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (16): 1840–46. doi:10.4161/cc.5.16.3016.
- Giard, Donald J., Stuart A. Aaronson, George J. Todaro, Paul Arnstein, John H. Kersey, Harvey Dosik, and Wade P. Parks. 1973. "In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors." *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5): 1417–23. doi:10.1093/jnci/51.5.1417.
- Gottlieb, A. A. 1991. "Clinical and Immunologic Observations in Patients with AIDS-Related Complex Treated with IMREG-1." *International Journal of*

*Immunopharmacology* 13 Suppl 1: 29–32.

- Gottlieb, A. A., G. A. Maziarz, N. Tamaki, and S. B. Sutcliffe. 1980. “The Effects of Dialyzable Products from Human Leukocyte Extracts on Cutaneous Delayed-Hypersensitivity Response.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 124 (2): 885–92.
- Gottlieb, M. S., R. A. Zackin, M. Fiala, D. H. Henry, A. J. Marcel, K. L. Combs, J. Vieira, H. A. Liebman, L. A. Cone, and K. S. Hillman. 1991. “Response to Treatment with the Leukocyte-Derived Immunomodulator IMREG-1 in Immunocompromised Patients with AIDS-Related Complex. A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.” *Annals of Internal Medicine* 115 (2): 84–91.
- Hanauer, Stephen B., Brian G. Feagan, Gary R. Lichtenstein, Lloyd F. Mayer, S. Schreiber, Jean Frederic Colombel, Daniel Rachmilewitz, et al. 2002. “Maintenance Infliximab for Crohn’s Disease: The ACCENT I Randomised Trial.” *Lancet (London, England)* 359 (9317): 1541–49. doi:10.1016/S0140-6736(02)08512-4.
- Hanauer, Stephen B., William J. Sandborn, Paul Rutgeerts, Richard N. Fedorak, Milan Lukas, Donald MacIntosh, Remo Panaccione, Douglas Wolf, and Paul Pollack. 2006. “Human Anti-Tumor Necrosis Factor Monoclonal Antibody (adalimumab) in Crohn’s Disease: The CLASSIC-I Trial.” *Gastroenterology* 130 (2): 323–33; quiz 591. doi:10.1053/j.gastro.2005.11.030.
- Hidalgo, Manuel, and S. Gail Eckhardt. 2001. “Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy.” *Journal of the National Cancer Institute* 93 (3): 178–93. doi:10.1093/jnci/93.3.178.
- Huguët, E. L., J. A. McMahon, A. P. McMahon, R. Bicknell, and A. L. Harris. 1994. “Differential Expression of Human Wnt Genes 2, 3, 4, and 7B in Human Breast Cell Lines and Normal and Disease States of Human Breast Tissue.” *Cancer Research* 54 (10): 2615–21.
- I, Bjarnason, Hayllar J, MacPherson Aj, and Russell As. 1993. “Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on the Small and Large Intestine in Humans.” *Gastroenterology* 104 (6): 1832–47.
- Ito, Hiroaki, Masakazu Takazoe, Yoshihiro Fukuda, Toshifumi Hibi, Kazuo Kusugami, Akira Andoh, Takayuki Matsumoto, et al. 2004. “A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn’s Disease.” *Gastroenterology* 126 (4): 989–96; discussion 947.
- Jaffee, Elizabeth M. 1999. “Immunotherapy of Cancer.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 886 (1): 67–72. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb09401.x.
- Jain, S, H C Thomas, and S Sherlock. 1977. “Transfer Factor in the Attempted Treatment of Patients with HBsAg-Positive Chronic Liver Disease.” *Clinical and Experimental Immunology* 30 (1): 10–15.
- Jenkins, Janelle E., Sujatha Sampath, Emily Butler, Jihyun Kim, Robert W. Henning, Gregory P. Holland, and Jeffery L. Yarger. 2013. “Characterizing the Secondary Protein Structure of Black Widow Dragline Silk Using Solid-State NMR and X-Ray Diffraction.” *Biomacromolecules* 14 (10): 3472–83. doi:10.1021/bm400791u.
- Khan, A., B. Hansen, N. O. Hill, E. Loeb, A. S. Pardue, and J. M. Hill. 1981. “Transfer Factor in the Treatment of Herpes Simplex Types 1 and 2.”

- Dermatologica* 163 (2): 177–85.
- Kirkpatrick, C. H. 2000. “Transfer Factors: Identification of Conserved Sequences in Transfer Factor Molecules.” *Molecular Medicine* 6 (4): 332–41.
  - Klesius, P. H., H. H. Fudenberg, and C. L. Smith. 1980. “Comparative Studies on Dialyzable Leukocyte Extracts Containing Transfer Factor--a Review.” *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302667168>.
  - Knowles, B. B., C. C. Howe, and D. P. Aden. 1980. “Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen.” *Science (New York, N.Y.)* 209 (4455): 497–99.
  - Krishnaveni, Marimuthu. 2013. “A Review on Transfer Factor an Immune Modulator.” *Drug Invention Today* 5 (2): 153–56. doi:10.1016/j.dit.2013.04.002.
  - Lara. 2010. “Clinical and Immunological Assessment in Breast Cancer Patients Receiving Anticancer Therapy and Bovine Dialyzable Leukocyte Extract as an Adjuvant.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 1 (3). doi:10.3892/etm\_00000066.
  - Lara, Humberto H, Liliana Ixtepan-Turrent, Elsa N Garza-Treviño, Jose I Badillo-Almaraz, and Cristina Rodriguez-Padilla. 2011. “Antiviral Mode of Action of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection.” *BMC Research Notes* 4 (November): 474. doi:10.1186/1756-0500-4-474.
  - Lawrence, H. S., and W. Borkowsky. 1996. “Transfer Factor--Current Status and Future Prospects.” *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)* 9 (1-3): 1–5.
  - Lawrence, H. Sherwood. 1955. “THE TRANSFER IN HUMANS OF DELAYED SKIN SENSITIVITY TO STREPTOCOCCAL M SUBSTANCE AND TO TUBERCULIN WITH DISRUPTED LEUCOCYTES 12.” *Journal of Clinical Investigation* 34 (2): 219–30.
  - Lawrence, T. 2009. “The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (6): a001651–a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651.
  - Lee, S. M., D. C. Betticher, and N. Thatcher. 1995. “Melanoma: Chemotherapy.” *British Medical Bulletin* 51 (3): 609–30.
  - Levin, A. S., L. E. Spitler, D. P. Stites, and H. H. Fudenberg. 1970. “Wiskott-Aldrich Syndrome, a Genetically Determined Cellular Immunologic Deficiency: Clinical and Laboratory Responses to Therapy with Transfer Factor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67 (2): 821–28.
  - Lissoni, P., F. Brivio, L. Fumagalli, G. Messina, S. Meregalli, G. Porro, F. Rovelli, L. Vigorè, E. Tisi, and G. D’Amico. 2009. “Effects of the Conventional Antitumor Therapies Surgery, Chemotherapy, Radiotherapy and Immunotherapy on Regulatory T Lymphocytes in Cancer Patients.” *Anticancer Research* 29 (5): 1847–52.
  - Liu, Li, Yichen Cao, Charles Chen, Xiaomei Zhang, Angela McNabola, Dean Wilkie, Scott Wilhelm, Mark Lynch, and Christopher Carter. 2006. “Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5.” *Cancer Research* 66 (24): 11851–58. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1377.
  - Mannon, Peter J., Ivan J. Fuss, Lloyd Mayer, Charles O. Elson, William J.



- Sandborn, Daniel Present, Ben Dolin, et al. 2004. "Anti-Interleukin-12 Antibody for Active Crohn's Disease." *The New England Journal of Medicine* 351 (20): 2069–79. doi:10.1056/NEJMoa033402.
- Martínez-Maqueda, Daniel, Beatriz Miralles, and Isidra Recio. 2015. "HT29 Cell Line." In *The Impact of Food Bioactives on Health*, edited by Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, and Harry Wichers, 113–24. Springer International Publishing. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-16104-4\\_11](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-16104-4_11).
  - Masi, M., C. De Vinci, and O. R. Baricordi. 1996. "Transfer Factor in Chronic Mucocutaneous Candidiasis." *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)* 9 (1-3): 97–103.
  - Massagué, Joan, and Anna C. Obenauf. 2016. "Metastatic Colonization by Circulating Tumour Cells." *Nature* 529 (7586): 298–306. doi:10.1038/nature17038.
  - Merchand-Reyes, Giovanna, Lenin Pavón, Gilberto Pérez-Sánchez, Said Vázquez-Leyva, Noemí Salinas-Jazmín, Marco Velasco-Velázquez, Emilio Medina-Rivero, and Sonia Mayra Pérez-Tapia. 2015. "Swine Dialyzable Spleen Extract as Antiviral Prophylaxis." *Journal of Medicinal Food* 18 (11): 1239–46. doi:10.1089/jmf.2014.0176.
  - Michlewska, Sylwia, Ian Dransfield, Ian L. Megson, and Adriano G. Rossi. 2009. "Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Is Critically Regulated by the Opposing Actions of pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Agents: Key Role for TNF-Alpha." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (3): 844–54. doi:10.1096/fj.08-121228.
  - Micic, M., A. Chen, R. M. Leblanc, and V. T. Moy. 1999. "Scanning Electron Microscopy Studies of Protein-Functionalized Atomic Force Microscopy Cantilever Tips." *Scanning* 21 (6): 394–97.
  - Moerkens, Marja, Yinghui Zhang, Lynn Wester, Bob van de Water, and John H. N. Meerman. 2014. "Epidermal Growth Factor Receptor Signalling in Human Breast Cancer Cells Operates Parallel to Estrogen Receptor  $\alpha$  Signalling and Results in Tamoxifen Insensitive Proliferation." *BMC Cancer* 14: 283. doi:10.1186/1471-2407-14-283.
  - Moisés A. Franco-Molina. 2011. "Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human Macrophages." *African Journal of Microbiology Research* 5 (22). doi:10.5897/AJMR11.578.
  - Moody, T. W., J. Leyton, A. Martinez, S. Hong, A. Malkinson, and J. L. Mulshine. 1998. "Lipoxygenase Inhibitors Prevent Lung Carcinogenesis and Inhibit Non-Small Cell Lung Cancer Growth." *Experimental Lung Research* 24 (4): 617–28.
  - Nair, Sandhya V. G., Menik Hettihewa, H. P. Vasantha Rupasinghe, Sandhya V. G. Nair, Menik Hettihewa, and H. P. Vasantha Rupasinghe. 2014. "Apoptotic and Inhibitory Effects on Cell Proliferation of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells by Methanol Leaf Extract of *Costus Speciosus*, Apoptotic and Inhibitory Effects on Cell Proliferation of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells by Methanol Leaf Extract of *Costus Speciosus*." *BioMed Research International, BioMed Research International* 2014, 2014 (April): e637098. doi:10.1155/2014/637098, 10.1155/2014/637098.

- Oeckinghaus, A., and S. Ghosh. 2009. "The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (4): a000034–a000034. doi:10.1101/cshperspect.a000034.
- Ojeda, Miriam Ojeda, Cornelis van't Veer, Celia B. Fernández Ortega, Manuel de J. Araña Rosainz, and Wim A. Buurman. 2005. "Dialyzable Leukocyte Extract Differentially Regulates the Production of TNFalpha, IL-6, and IL-8 in Bacterial Component-Activated Leukocytes and Endothelial Cells." *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 54 (2): 74–81. doi:10.1007/s00011-004-1326-5.
- Osborne, C. Kent, Valerie Bardou, Torsten A. Hopp, Gary C. Chamness, Susan G. Hilsenbeck, Suzanne A. W. Fuqua, Jiemin Wong, D. Craig Allred, Gary M. Clark, and Rachel Schiff. 2003. "Role of the Estrogen Receptor Coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in Tamoxifen Resistance in Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 95 (5): 353–61. doi:10.1093/jnci/95.5.353.
- Osborne, C. K., B. Hamilton, G. Titus, and R. B. Livingston. 1980. "Epidermal Growth Factor Stimulation of Human Breast Cancer Cells in Culture." *Cancer Research* 40 (7): 2361–66.
- Parhar, Ranjit S., Yufei Shi, Minjing Zou, Nadir R. Farid, Peter Ernst, and Sultan T. Al-Sedairy. 1995. "Effects of Cytokine-Mediated Modulation of nm23 Expression on the Invasion and Metastatic Behavior of B16F10 Melanoma Cells." *International Journal of Cancer* 60 (2): 204–10. doi:10.1002/ijc.2910600213.
- Pelton, John T., and Larry R. McLean. 2000. "Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure." *Analytical Biochemistry* 277 (2): 167–76. doi:10.1006/abio.1999.4320.
- Picard, Martin, Kathryn White, and Douglass M. Turnbull. 2013. "Mitochondrial Morphology, Topology, and Membrane Interactions in Skeletal Muscle: A Quantitative Three-Dimensional Electron Microscopy Study." *Journal of Applied Physiology* 114 (2): 161–71. doi:10.1152/japplphysiol.01096.2012.
- Pilotti, V., M. Mastroiilli, G. Pizza, C. De Vinci, L. Busutti, A. Palareti, G. Gozzetti, and A. Cavallari. 1996. "Transfer Factor as an Adjuvant to Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Therapy." *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)* 9 (1-3): 117–21.
- Pineda, B., S. Estrada-Parra, B. Pedraza-Medina, A. Rodriguez-Ropon, R. Pérez, and O. Arrieta. 2005. "Interstitial Transfer Factor as Adjuvant Immunotherapy for Experimental Glioma." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 24 (4): 575–83.
- Pizza, G., C. De Vinci, D. Cuzzocrea, D. Menniti, E. Aiello, P. Maver, G. Corrado, et al. 1996. "A Preliminary Report on the Use of Transfer Factor for Treating Stage D3 Hormone-Unresponsive Metastatic Prostate Cancer." *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)* 9 (1-3): 123–32.
- Poon, Ronnie T., and Sheung Tat Fan. 2004. "Resection prior to Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Strategy of Optimizing the Role of Resection and Transplantation in Cirrhotic Patients with Preserved Liver Function." *Liver Transplantation* 10 (6): 813–15. doi:10.1002/lt.20175.
- Rajeswaran, Anand, Andreas Trojan, Bernard Burnand, and Massimo Giannelli. 2008. "Efficacy and Side Effects of Cisplatin- and Carboplatin-Based Doublet Chemotherapeutic Regimens versus Non-Platinum-Based

- Doublet Chemotherapeutic Regimens as First Line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Carcinoma: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials.” *Lung Cancer* 59 (1): 1–11. doi:10.1016/j.lungcan.2007.07.012.
- Restifo, Nicholas P., Mark E. Dudley, and Steven A. Rosenberg. 2012. “Adoptive Immunotherapy for Cancer: Harnessing the T Cell Response.” *Nature Reviews Immunology* 12 (4): 269–81. doi:10.1038/nri3191.
  - Rioux, N., and A. Castonguay. 1998. “Inhibitors of Lipoxygenase: A New Class of Cancer Chemopreventive Agents.” *Carcinogenesis* 19 (8): 1393–1400.
  - Roda, E., D. Viza, G. Pizza, L. Mastroroberto, J. Phillips, C. De Vinci, and L. Barbara. 1985. “Transfer Factor for the Treatment of HBsAg-Positive Chronic Active Hepatitis.” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 178 (3): 468–75.
  - Rutgeerts, Paul, William J. Sandborn, Brian G. Feagan, Walter Reinisch, Allan Olson, Jewel Johanns, Suzanne Travers, et al. 2005. “Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis.” *New England Journal of Medicine* 353 (23): 2462–76. doi:10.1056/NEJMoa050516.
  - Salgin, Sema, Uğur Salgin, and Seda Bahadır. 2013. “Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths.” *ResearchGate* 7 (January): 12404.
  - Salinas-Jazmín, Nohemí, Sergio Estrada-Parra, Miguel Angel Becerril-García, Alberto Yairh Limón-Flores, Said Vázquez-Leyva, Emilio Medina-Rivero, Lenin Pavón, Marco Antonio Velasco-Velázquez, and Sonia Mayra Pérez-Tapia. 2015. “Herpes Murine Model as a Biological Assay to Test Dialyzable Leukocyte Extracts Activity.” *Journal of Immunology Research* 2015: 1–9. doi:10.1155/2015/146305.
  - Saltz, Leonard B., Neal J. Meropol, Patrick J. Loehrer, Michael N. Needle, Justin Kopit, and Robert J. Mayer. 2004. “Phase II Trial of Cetuximab in Patients with Refractory Colorectal Cancer That Expresses the Epidermal Growth Factor Receptor.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (7): 1201–8. doi:10.1200/JCO.2004.10.182.
  - Sánchez-González, Dolores J., Carlos A. Sosa-Luna, and Ismael Vázquez-Moctezuma. 2011. “[Transfer factors in medical therapy].” *Medicina Clínica* 137 (6): 273–77. doi:10.1016/j.medcli.2010.05.002.
  - Sandborn, William J., Brian G. Feagan, Richard N. Fedorak, Ellen Scherl, Mark R. Fleisher, Seymour Katz, Jewel Johanns, Marion Blank, and Paul Rutgeerts. 2008. “A Randomized Trial of Ustekinumab, a Human Interleukin-12/23 Monoclonal Antibody, in Patients With Moderate-to-Severe Crohn’s Disease.” *Gastroenterology* 135 (4): 1130–41. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.014.
  - Sandborn, William J., Stefan Schreiber, Brian G. Feagan, Paul Rutgeerts, Ziad H. Younes, Ralph Bloomfield, Geoffroy Coteur, Juan Pablo Guzman, and Geert R. D’Haens. 2011. “Certolizumab Pegol for Active Crohn’s Disease: A Placebo-Controlled, Randomized Trial.” *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 9 (8): 670–78.e3. doi:10.1016/j.cgh.2011.04.031.

- Scheller, Jürgen, Athena Chalaris, Dirk Schmidt-Arras, and Stefan Rose-John. 2011. "The pro- and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (5): 878–88. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- Schreiber, Stefan, Paul Rutgeerts, Richard N. Fedorak, Munaa Khaliq-Kareemi, Michael A. Kamm, Michel Boivin, Charles N. Bernstein, et al. 2005. "A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Certolizumab Pegol (CDP870) for Treatment of Crohn's Disease." *Gastroenterology* 129 (3): 807–18. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.064.
- Siegel, Rebecca, Deepa Naishadham, and Ahmedin Jemal. 2012. "Cancer Statistics for Hispanics/Latinos, 2012." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 62 (5): 283–98. doi:10.3322/caac.21153.
- Silverstein, Fred E., David Y. Graham, John R. Senior, Helen Wyn Davies, Barbara J. Struthers, Richard M. Bittman, and G. Steven Geis. 1995. "Misoprostol Reduces Serious Gastrointestinal Complications in Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Annals of Internal Medicine* 123 (4): 241–49. doi:10.7326/0003-4819-123-4-199508150-00001.
- Singh G, Ramey D, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT, and Fries JF. 1996. "Gastrointestinal Tract Complications of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Treatment in Rheumatoid Arthritis: A Prospective Observational Cohort Study." *Archives of Internal Medicine* 156 (14): 1530–36. doi:10.1001/archinte.1996.00440130066007.
- Soriano, Ariel F., Barbara Helfrich, Daniel C. Chan, Lynn E. Heasley, Paul A. Bunn, and Ting-Chao Chou. 1999. "Synergistic Effects of New Chemopreventive Agents and Conventional Cytotoxic Agents against Human Lung Cancer Cell Lines." *Cancer Research* 59 (24): 6178–84.
- Steele, R. W., M. G. Myers, and M. M. Vincent. 1980. "Transfer Factor for the Prevention of Varicella-Zoster Infection in Childhood Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 303 (7): 355–59. doi:10.1056/NEJM198008143030702.
- Stevenson, D. 1984. "Diagnosis, Prevention, and Treatment of Adverse Reactions to Aspirin and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 74 (4): 617–22. doi:10.1016/0091-6749(84)90115-5.
- Sugarman, B. J., B. B. Aggarwal, P. E. Hass, I. S. Figari, M. A. Palladino, and H. M. Shepard. 1985. "Recombinant Human Tumor Necrosis Factor-Alpha: Effects on Proliferation of Normal and Transformed Cells in Vitro." *Science (New York, N.Y.)* 230 (4728): 943–45.
- Sun, Weijing, and Lynn M. Schuchter. 2001. "Metastatic Melanoma." *Current Treatment Options in Oncology* 2 (3): 193–202. doi:10.1007/s11864-001-0033-5.
- Sun, W., and L. M. Schuchter. 2001. "Metastatic Melanoma." *Current Treatment Options in Oncology* 2 (3): 193–202.
- Surewicz, Witold K., Henry H. Mantsch, and Dennis Chapman. 1993. "Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assessment." *Biochemistry* 32 (2): 389–94. doi:10.1021/bi00053a001.
- Takayama, T., M. Makuuchi, S. Hirohashi, M. Sakamoto, J. Yamamoto, K. Shimada, T. Kosuge, S. Okada, K. Takayasu, and S. Yamasaki. 1998. "Early

- Hepatocellular Carcinoma as an Entity with a High Rate of Surgical Cure.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 28 (5): 1241–46. doi:10.1002/hep.510280511.
- Targan, S. R., S. B. Hanauer, S. J. van Deventer, L. Mayer, D. H. Present, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible, and P. J. Rutgeerts. 1997. “A Short-Term Study of Chimeric Monoclonal Antibody cA2 to Tumor Necrosis Factor Alpha for Crohn’s Disease. Crohn’s Disease cA2 Study Group.” *The New England Journal of Medicine* 337 (15): 1029–35. doi:10.1056/NEJM199710093371502.
  - Tee, Yi-Torng, Gin-Den Chen, Long-Yau Lin, Jiunn-Liang Ko, and Po-Hui Wang. 2006. “Nm23-H1: A Metastasis-Associated Gene.” *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 45 (2): 107–13. doi:10.1016/S1028-4559(09)60206-0.
  - Toedter, Gary P., Marion Blank, Yinghua Lang, Dion Chen, William J. Sandborn, and Willem J. S. de Villiers. 2009. “Relationship of C-Reactive Protein with Clinical Response after Therapy with Ustekinumab in Crohn’s Disease.” *The American Journal of Gastroenterology* 104 (11): 2768–73. doi:10.1038/ajg.2009.454.
  - Touil, Y., W. Igoudjil, M. Corvaisier, A.-F. Dessein, J. Vandomme, D. Monte, L. Stechly, et al. 2014. “Colon Cancer Cells Escape 5FU Chemotherapy-Induced Cell Death by Entering Stemness and Quiescence Associated with the c-Yes/YAP Axis.” *Clinical Cancer Research* 20 (4): 837–46. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1854.
  - Tsai, S. L., Y. F. Liaw, M. H. Chen, C. Y. Huang, and G. C. Kuo. 1997. “Detection of Type 2-like T-Helper Cells in Hepatitis C Virus Infection: Implications for Hepatitis C Virus Chronicity.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 25 (2): 449–58. doi:10.1002/hep.510250233.
  - Vacek, A., M. Hofer, J. Hromas, E. Luksíková, J. Svoboda, and H. Schneiderová. 2002. “Hemopoiesis-Stimulating Effects and Enhanced Survival of Irradiated Mice after Peroral or Intraperitoneal Administration of Ultrafiltered Pig Leukocyte Extract (UPLE, IMUNOR).” *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 24 (4): 651–64. doi:10.1081/IPH-120016049.
  - Verhoef, C. M., J. A. G van Roon, F. P. J. G Lefeber, and J. W. J Bijlsma. 2001. “T1/T2 Cell Balance in Rheumatoid Arthritis.” *Clinical and Applied Immunology Reviews, Advances in Immunology/Allergology in XXI Century*, 1 (3–4): 153–61. doi:10.1016/S1529-1049(01)00025-3.
  - Viza, D., J. M. Vich, J. Phillips, F. Rosenfeld, and D. A. Davies. 1986. “Specific Transfer Factor Protects Mice against Lethal Challenge with Herpes Simplex Virus.” *Cellular Immunology* 100 (2): 555–62.
  - Weitz, Jürgen, Moritz Koch, Jürgen Debus, Thomas Höhler, Peter R. Galle, and Markus W. Büchler. 2005. “Colorectal Cancer.” *Lancet (London, England)* 365 (9454): 153–65. doi:10.1016/S0140-6736(05)17706-X.
  - Wiebe, Valerie J., C. Kent Osborne, Suzanne A. W. Fuqua, and Michael W. DeGregorio. 1993. “Tamoxifen Resistance in Breast Cancer.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 14 (3): 173–88. doi:10.1016/1040-8428(93)90008-R.
  - Wilhelm, Scott M., Christopher Carter, Liya Tang, Dean Wilkie, Angela McNabola, Hong Rong, Charles Chen, et al. 2004. “BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis.” *Cancer Research* 64 (19): 7099–7109. doi:10.1158/0008-

5472.CAN-04-1443.

- Wilson, G. B., C. Poindexter, J. D. Fort, and K. D. Ludden. 1988. "De Novo Initiation of Specific Cell-Mediated Immune Responsiveness in Chickens by Transfer Factor (specific Immunity Inducer) Obtained from Bovine Colostrum and Milk." *Acta Virologica* 32 (1): 6–18.
- Wolff, H., K. Saukkonen, S. Anttila, A. Karjalainen, H. Vainio, and A. Ristimäki. 1998. "Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Lung Carcinoma." *Cancer Research* 58 (22): 4997–5001.
- Wu, Yueting, Wentao Deng, and David J. Klinke II. 2015. "Exosomes: Improved Methods to Characterize Their Morphology, RNA Content, and Surface Protein Biomarkers." *The Analyst* 140 (19): 6631–42. doi:10.1039/C5AN00688K.
- Yamamoto, Yumi, and Richard B. Gaynor. 2001. "Therapeutic Potential of Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in the Treatment of Inflammation and Cancer." *Journal of Clinical Investigation* 107 (2): 135–42.
- Zajícová, A., E. Javorková, P. Trošan, M. Chudíčková, M. Krulová, and V. Holáň. 2014. "A Low-Molecular-Weight Dialysable Leukocyte Extract Selectively Enhances Development of CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T Cells and IL-17 Production." *Folia Biologica* 60 (6): 253–60.
- Zhang, Peilin, Wei Yi Gao, Steven Turner, and Barbara S. Ducatman. 2003. "Gleevec (STI-571) Inhibits Lung Cancer Cell Growth (A549) and Potentiates the Cisplatin Effect in Vitro." *Molecular Cancer* 2: 1. doi:10.1186/1476-4598-2-1.